



HAL
open science

Processus régénératifs du cerveau moyen dorsal chez le poisson zèbre adulte

Aurélie Heuzé

► **To cite this version:**

Aurélie Heuzé. Processus régénératifs du cerveau moyen dorsal chez le poisson zèbre adulte. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS508 . tel-01968023

HAL Id: tel-01968023

<https://theses.hal.science/tel-01968023v1>

Submitted on 2 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Processus régénératifs du cerveau moyen dorsal chez le poisson zèbre

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'université Paris-Sud

École doctorale n°568 Biosigne
Signalisations et réseaux intégratifs en biologie
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Gif sur Yvette, le 08 décembre 2017, par

Aurélie Heuzé

Composition du Jury :

| | |
|--|-----------------------|
| Anne-Hélène Monsoro Burq Professeure, Université Paris-Sud XI (Institut Curie, Orsay) | Présidente |
| Sophie Vriz Professeure, Université Paris Diderot VII (CIRB, Collège de France) | Rapportrice |
| Filippo Del Bene Directeur de recherche, INSERM (Institut Curie, Paris) | Rapporteur |
| Sepand Rastegar Chargé de recherche, Karlsruhe Institute of Technology | Examineur |
| Jean-Stéphane Joly Directeur de recherche, INRA (NeuroPSI, Gif sur Yvette) | Directeur de thèse |
| Alessandro Alunni Chargé de recherche, CNRS (Institut Pasteur, Paris) | Co-Directeur de thèse |

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement Sophie Vriz, Filippo Del Bene, Sepand Rastegar et Anne-Hélène Monsoro-Burq d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Avant de commencer ma thèse, cela faisait déjà quelques années que je travaillais dans ce « couloir des fous ». Cette page est pour moi l'occasion de remercier toutes les personnes qui m'ont aidé au quotidien et qui font de ce lieu un chouette endroit pour travailler.

Je remercie Jean-Stéphane Joly pour m'avoir fait confiance alors que je n'étais qu'une toute jeune débutante en biologie moléculaire et d'avoir concrétisé mon envie de projet de recherche rien qu'à moi.

Merci à mon petit chef, Alessandro. J'ai adoré travailler avec toi quand tu faisais encore partie de notre équipe (même quand tu m'as exploité pour déchorionner les oeufs de médaka). Tellement que j'ai tout fait pour que tu participes à ce projet ! Merci pour tous tes conseils, relectures et discussions. Si un jour, tu te décides à monter ton équipe, je serai ravie d'en faire partie.

Merci à Sylvie, ton écoute et ton soutien au cours de toutes ces années m'ont été très précieux. Nos discussions chaussures, aussi !

Je remercie Franck pour tous ses conseils et toutes les corrections de ce manuscrit. Les discussions scientifiques partagées avec toi sont toujours enrichissantes.

Durant ces années, j'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables qui font maintenant partie de mes amis les plus proches. Tous, vous avez su me soutenir au quotidien donc un très grand merci à Karen (ma poulette, ça me manque beaucoup de ne plus travailler à tes côtés, d'ailleurs si un jour tu montes ton équipe, je serai ravie d'en faire partie), Emilie (ma Liliane ou ma Catherine, je ne sais plus qui est qui !) & Alessandro (partager tous ces moments de joie, d'hystérie et parfois de désespoir avec vous deux font partie de mes plus beaux souvenirs de thèse, d'ailleurs si l'un d'entre vous monte une équipe, je serai ravie de travailler avec l'un d'entre vous !), Yan & Hélène (et tous ces zombies massacrés), Jean-Michel (entre autres pour toutes les pauses thé et chocolats partagées et cette culture que tu essaies patiemment de m'inculquer), Maryline (et tes merveilleux fous rires), Johanna (et également tes merveilleux fous rires), Ingrid (ça me manque de ne pas t'entendre râler dans le couloir) et Hélène (qui m'a initiée aux Birkenstock).

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe passés et présents avec qui j'ai partagé mon bureau et échangé de nombreux fous rires et discussions scientifiques : Stéphanie (merci aussi de m'aider à surmonter ma phobie administrative), Tibi, Rosaria, Olivier, Sylvia, Zlatko...

Un grand merci aux équipes voisines pour participer à la bonne ambiance générale : Deca, Amagen, Bioémergences et le TCF !

Et un énorme merci aux personnels de l'animalerie, notamment Elliott Henry, Sara Chaix, Julien Hémon et mon Homme qui ont pris/prennent grand soin de mes bébés poissons.

Je remercie mes parents, ma sœur, mon frère, ma famille et belle-famille pour leur soutien.

Merci à mes deux bébés d'amour qui m'aident au jour le jour à tout relativiser.

Et enfin un énorme merci mon Chouchou. Sans ton soutien et ton amour rien de tout ça n'aurait été possible.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Introduction générale | 15 |
| Chapitre 1 : le toit optique de poisson zèbre, un modèle d'étude de neurogenèse constitutive | 21 |
| I – La neurogenèse constitutive..... | 21 |
| 1. La neurogenèse embryonnaire | 21 |
| 2. La neurogenèse adulte | 27 |
| II – Le toit optique..... | 34 |
| 1. Description anatomique et organisation du toit optique | 34 |
| 2. Origine embryonnaire du TO..... | 37 |
| 3. Neurogenèse adulte dans le TO | 38 |
| Chapitre 2 : Neurogenèse régénérative | 41 |
| I- Régénération et neurogenèse régénérative | 41 |
| 1. La régénération : définition et concepts historiques | 41 |
| 2. La neurogenèse régénérative, un domaine de recherche à potentiel thérapeutique..... | 43 |
| II-Régénération neuronale à partir de progéniteurs constitutifs | 45 |
| 1. A partir de progéniteurs gliaux chez les mammifères..... | 45 |
| 2. A partir de progéniteurs gliaux chez le poisson zèbre | 46 |
| 3. A partir de progéniteurs neuroépithéliaux | 48 |
| III- Régénération neuronale à partir de progéniteurs latents | 49 |
| 1. Réactivation de progéniteurs latents dans la rétine | 50 |
| 2. Réactivation de progéniteurs latents dans la moelle épinière..... | 57 |
| 3. Réactivation des progéniteurs latents chez les rongeurs..... | 65 |
| IV- Inflammation : un processus aux conséquences différentes selon les espèces..... | 65 |
| 1. Rôle négatif de l'inflammation sur les cellules souches neurales chez les mammifères | 67 |
| 2. Rôle positif de l'inflammation sur les cellules souches neurales chez les mammifères | 68 |
| 3. Inflammation dans le SNC de poisson zèbre | 68 |
| Objectif de l'étude | 69 |
| Chapitre 1 – Crible de séquences régulatrices actives dans les cellule du toit optique | 73 |
| I- Introduction..... | 73 |
| 1. Choix des séquences régulatrices à tester | 73 |
| 2. Design du vecteur de transgénèse | 74 |

| | |
|--|------------|
| II- Résultats | 75 |
| 1. L'élément Dr282 est actif dans des progéniteurs du tectum et dans des cellules différenciées d'autres régions du cerveau..... | 75 |
| 2. L'élément Dr830 est actif dans les progéniteurs du TO | 78 |
| Chapitre 2 – Etude de la régénération neuronale du toit optique chez le poisson zèbre adulte | 81 |
| I- Article en préparation | 81 |
| II- Données complémentaires | 104 |
| 1. Expériences en cours..... | 104 |
| 2. Caractérisation d'un pont entre toit optique et torus semicircularis | 105 |
| 3. Dissection de la séquence régulatrice Dr830 | 105 |
| Chapitre 3 – Etude des capacités de régénération neuronale du tectum chez la larve de poisson zèbre par imagerie live | 111 |
| I- Introduction..... | 111 |
| II- Résultats | 113 |
| 1. Régénération neuronale à la suite d'une lésion chimique..... | 113 |
| 2. Régénération neuronale à la suite d'une photoablation | 115 |
| III- Perspectives..... | 117 |
| Discussion générale..... | 121 |
| Annexe..... | 131 |
| Références bibliographiques | 137 |

Liste d'abréviations

| | |
|------|--|
| AVC | Accident vasculaire cérébral |
| bHLH | basic helix-loop-helix |
| BLBP | Brain lipid binding protein |
| BrdU | Bromodéoxyuridine |
| CMZ | Ciliary marginal zone |
| dpf | day post-fertilization |
| dpl | day post-lesion |
| GCL | Ganglion cell layer |
| Hsp | Heat shock protein |
| INL | Inner nuclear layer |
| INM | Interkinetic nuclear migration |
| IPZ | Isthmic proliferative zone |
| MHB | Midbrain hindbrain boundary |
| mKR | KillerRed membranaire |
| NEC | Neuroepithelial cell |
| nIPC | Neuronal intermediate progenitor cell |
| NTR | Nitroreductase |
| oIPC | Oligodendrocytic intermediate progenitor cell |
| ONL | Outer nuclear layer |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen |
| PGZ | Periventricular grey zone |
| PML | Posterior mesencephalic lamina/Peripheral midbrain layer |
| PVIN | Periventricular interneuron |
| PVN | Periventricular neuron |
| PVPN | Periventricular projection neuron |
| RGC | Radial glial cell |
| RMS | Rostral migratory stream |
| ROS | Reactive oxygen species |

SAC *Stratum album centrale*
SFGS *Stratum fibrosum et griseum superficiale*
SGC *Stratum griseum centrale*
SGZ Subgranular zone
SO *Stratum opticum*
SPV *Stratum periventriculare*
SIN Superficial interneuron
SNC Système nerveux central
SVZ Subventricular zone
TMZ Tectal marginal zone
TO Toit Optique
TPZ Tectal proliferative zone

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, l'homme est fasciné par la régénération et par l'éventuelle possibilité, d'un jour, devenir immortel. Dans la mythologie grecque, de nombreux épisodes mettent en scène la renaissance perpétuelle et la quête d'immortalité. Prométhée, puni par les dieux pour leur avoir volé le feu, fut condamné à être enchaîné à un rocher, son foie exposé à un aigle qui chaque jour s'en nourrissait. Chaque nuit, l'organe n'avait de cesse de repousser, offrant à l'aigle un perpétuel repas et assurant à Prométhée un éternel supplice.

Cette fascination se transforma en domaine de recherche scientifique, lorsqu'en 1712, le scientifique français Réaumur présenta à l'Académie française une des toutes premières études sur la régénération basée sur ses observations de la régénération des appendices de l'écrevisse. Par la suite, plusieurs autres éminents scientifiques du XVIII^{ème} siècle, âge d'or de la recherche sur la régénération, que sont Trembley, Bonnet, Pallas et Spallanzani décrivent toute une variété d'animaux aux capacités de régénération remarquables. L'hydre, le ver de terre et la planaire peuvent régénérer leur tête et leur queue, la salamandre peut régénérer ses membres, queue et mâchoire, la grenouille et le crapaud pré-métamorphiques peuvent régénérer leur queue et membres, la limace peut régénérer ses tentacules et l'escargot sa tête.

Au début du XX^{ème} siècle, malgré des travaux sur la plasticité cellulaire de la planaire menés par Morgan, la fondation de la génétique et de l'embryologie modernes avec le développement des modèles animaux classiques tels que la drosophile, la souris et *C. elegans* ont détourné les scientifiques de la régénération. Néanmoins, depuis quelques décennies, les modèles animaux classiques d'études de la régénération comme l'hydre, la planaire, la salamandre, l'axolotl ainsi que de nouveaux modèles comme le poisson zèbre intéressent de plus en plus de laboratoires. Ce regain d'intérêt pour la régénération n'est pas seulement dû aux nouvelles techniques permettant de caractériser les processus régénératifs des points de vue moléculaire, cellulaire et génétique mais également parce que la compréhension de comment des animaux très variés peuvent régénérer de manière naturelle peut fournir de nouveaux concepts pour la médecine régénérative.

Les découvertes majeures de ces dernières années ont mené à la conclusion générale que des cellules progénitrices sont nécessaires à la majorité des processus de régénération. L'origine de ces cellules varie selon les systèmes de régénération. Dans certains cas, comme pour la

régénération de la peau, du sang, des muscles et des os chez les mammifères et le remplacement de tissus endommagés chez la planaire, des cellules progénitrices existent comme réserves cellulaires et ont besoin d'être activées en réponse à une blessure. Dans d'autres cas, les cellules progénitrices doivent être créées *de novo* à partir de cellules différenciées. Ce processus, appelé dédifférenciation, est dominant chez les vertébrés à haute capacité régénérative comme la salamandre.

Il a été longtemps admis que, chez les mammifères, les neurones, contrairement aux cellules du foie ou de la peau, n'étaient plus générés après la naissance. Pendant près d'un siècle, la neurogenèse s'est vue décrite et restreinte à la formation du système nerveux embryonnaire. En effet, le célèbre prix Nobel Ramon y Cajal érigea en dogme central l'hypothèse selon laquelle le cerveau adulte était un organe immuable et que, chez les mammifères, de nouveaux neurones ne pouvaient être générés après la naissance. Après les premières observations de neurones nouvellement générés dans différentes régions du cerveau de rat adulte réalisées par Altman en 1965, c'est dans les années 1990 que la démonstration formelle de l'existence d'une neurogenèse adulte à partir de cellules souches nerveuses persistantes est rapportée indépendamment par deux groupes de recherche chez la souris (Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Morshead et al., 1994) et chez l'homme (Eriksson et al., 1998). Chez les mammifères, les cellules souches adultes sont localisées au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et au niveau de la zone sous-ventriculaire, située sous la paroi des ventricules télencéphaliques latéraux. Des dommages au système nerveux, causés par des ischémies cérébrales, des lésions ou des maladies neurodégénératives provoquent une prolifération de ces cellules progénitrices chez les animaux modèles mammifères et les humains. Cependant, dans la plupart des cas, ces nouvelles cellules ne survivent pas très longtemps, échouent à migrer ou ne s'intègrent pas correctement au réseau neuronal.

Pourtant d'autres vertébrés non mammaliens possèdent des capacités remarquables de régénération. C'est le cas notamment du poisson zèbre qui peut régénérer ses nageoires, son cœur, son foie et même son système nerveux. Comprendre en détail les mécanismes moléculaires et cellulaires d'une telle capacité de régénération chez le poisson zèbre pourrait avoir une importance biomédicale en vue de l'induction d'un potentiel régénératif chez l'Homme. Des premières études vont déjà en ce sens, notamment celle de Kenneth Poss, paru dans la revue Science en 2016. Son équipe a montré que, lorsque le poisson zèbre a la moelle épinière sectionnée (le poisson est alors paralysé), un processus réparateur se déclenche avec la formation d'un pont de cellules gliales entre les deux bords de la blessure. Le poisson opéré

retrouve alors une mobilité parfaite huit semaines après la blessure. Un gène commun au poisson zèbre et à l'homme codant pour le facteur CTGF (connective tissue growth factor) a été identifié comme jouant un rôle clé dans la régénérescence cellulaire. Lorsque la protéine humaine recombinante CTGF a été délivrée à l'endroit d'une blessure de moelle épinière chez le poisson zèbre, les tissus se sont régénérés redonnant aux poissons leur mobilité. Cette protéine n'est pas suffisante pour réparer la moelle épinière chez l'Homme, le processus de réparation étant différent chez les mammifères notamment par le développement de tissus cicatriciels autour de la zone blessée. Néanmoins, ces résultats montrent qu'un potentiel régénératif reste présent chez des espèces aux capacités de régénération limitées.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la démarche de compréhension des mécanismes de régénération du système nerveux. Au cours de ma thèse, j'ai tenté de comprendre quels progéniteurs pouvaient être impliqués dans la régénération du cerveau moyen dorsal chez le poisson zèbre. Dans l'introduction je décrirai la neurogénèse constitutive et régénérative chez les mammifères et les poissons téléostéens. Je diviserai mes résultats en trois chapitres. Le premier chapitre présentera le résultat d'un crible de séquences génomiques non codantes potentiellement actives dans le toit optique de poisson zèbre. Le deuxième chapitre consistera en un article en préparation sur la régénération neuronale du toit optique chez le poisson zèbre adulte à la suite d'une lésion cérébrale. Le troisième chapitre portera sur la mise au point de lésions chez la larve de poisson zèbre. L'ensemble des résultats sera discuté dans la dernière partie de ce manuscrit.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE TOIT OPTIQUE DE POISSON ZEBRE, UN MODELE D'ETUDE DE NEUROGENESE CONSTITUTIVE

La neurogenèse décrit le processus au cours duquel des cellules progénitrices neurales génèrent des neurones matures et fonctionnels. Dans la première partie de ce chapitre, je comparerai les neurogenèses embryonnaire et adulte chez les vertébrés, plus précisément chez les mammifères et chez les poissons téléostéens. Je décrirai leurs points communs et soulignerai l'hétérogénéité de la neurogenèse adulte, notamment au niveau des types cellulaires qui la supportent. Dans une seconde partie, je m'intéresserai plus particulièrement à une structure du cerveau moyen chez le poisson zèbre, le toit optique, où des progéniteurs neuraux de type neuroépithélial participent activement à la neurogenèse adulte.

I – La neurogenèse constitutive

1. La neurogenèse embryonnaire

1.1 Du tube neural au cerveau embryonnaire

Le système nerveux des vertébrés se met en place au cours de la neurulation, à la suite de la gastrulation, étape qui permet la mise en place des trois feuillets embryonnaires (l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme). Il est formé par induction neurale. Le mésoderme induit la transformation d'une partie de l'ectoderme en un épithélium prismatique pseudostratifié appelé neurectoderme. Ce tissu correspond à la plaque neurale. Sur la face dorsale de l'embryon, le neurectoderme subit ensuite des mouvements morphogénétiques importants qui transforment la plaque neurale en tube neural. La partie caudale du tube neural est à l'origine de la moelle épinière alors que la partie rostrale formera le cerveau. Un renflement du tube neural, selon l'axe antéro-postérieur, entraîne la formation de trois vésicules, dès le stade neurula : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Les vésicules formant le prosencéphale et le rhombencéphale vont par la suite se subdiviser et donner naissance à un cerveau embryonnaire à 5 vésicules (**figure 1A**).

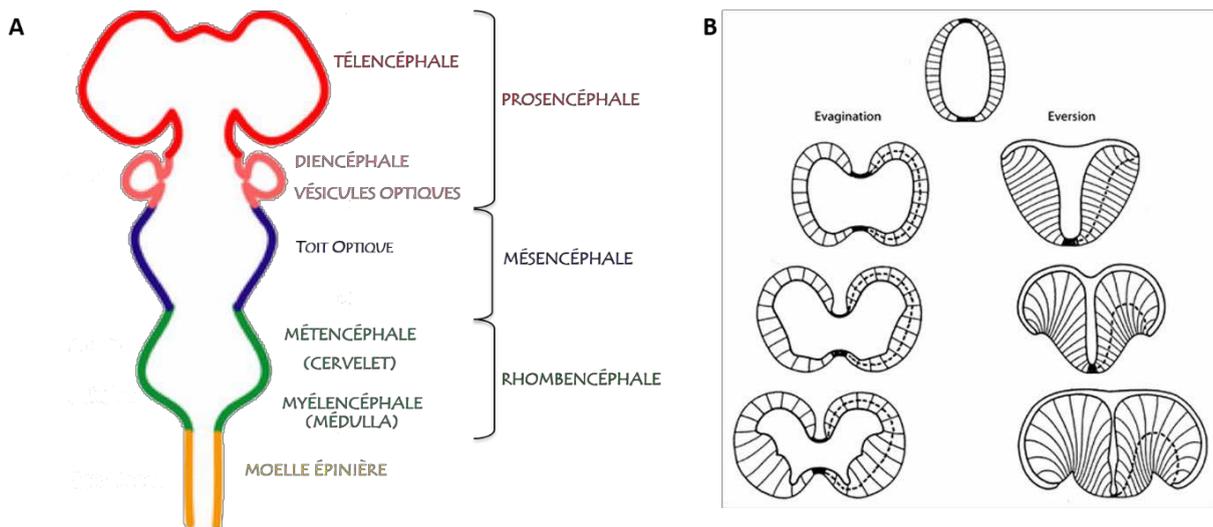


Figure 1 : Principales subdivisions du cerveau embryonnaire des vertébrés.

- A- Lors du développement, le système nerveux est d'abord composé de trois vésicules : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Ensuite, le prosencéphale et le rhombencéphale se subdivisent et le système nerveux est alors composé de cinq vésicules : le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale.
- B- Le télencéphale se développe de deux façons différentes chez les vertébrés. En haut : schéma d'une section transversale de tube neural. Ce stade de développement est commun à tous les vertébrés. A droite, chez les actinoptérygiens, le télencéphale se développe par éversion. Le toit du tube neural est réduit à une fine toile choroïde tandis que les parois s'épaississent et se replient. A gauche, chez les autres vertébrés, le télencéphale se développe par évagination, formant deux cavités ventriculaires distinctes. D'après Nieuwenhuys, 2009.

Le prosencéphale se subdivise en télencéphale, à l'origine des hémisphères cérébraux, de l'hippocampe et des lobes olfactifs, et en diencéphale, qui va s'invaginer bilatéralement pour former deux vésicules optiques et sera à l'origine de l'hypothalamus, du thalamus et du pré-tectum. Le mésencéphale reste sous la forme d'une vésicule unique et sera à l'origine du tectum ou toit optique (TO), organe modèle pour mon étude, ainsi que du tegmentum. Le rhombencéphale se divise en métencéphale et myélocéphale qui donneront respectivement le cervelet et la médulla.

Il est intéressant de noter que le développement du télencéphale des poissons à nageoires rayonnées (les actinoptérygiens) diffère de celui des autres vertébrés. En effet, celui-ci se forme à la suite d'une éversion des parties dorso-latérales du télencéphale primaire (Nieuwenhuys, 2009). Ainsi, à l'inverse des autres vertébrés, chez lesquels le développement se fait par évagination et forme deux ventricules télencéphaliques distincts, les téléostéens présentent un ventricule télencéphalique unique (**figure 1B**).

1.2 Les cellules progénitrices et cellules souches neurales

La définition stricte d'une cellule souche est la capacité de cette cellule à donner naissance à de multiples lignages cellulaires, idéalement à tous les types cellulaires d'un organe donné, et sa capacité à s'auto-renouveler *in vivo* ou *in vitro* un nombre indéfini de fois sans aucun changement significatif de son phénotype et de ses capacités de différenciation (Malatesta et al., 2008). En suivant cette définition, dans ce manuscrit, j'emploierai le terme de « cellule progénitrice » pour des cellules qui ont un nombre limité de divisions d'auto-renouvellement au cours du développement du système nerveux central (SNC). Le terme « cellule souche » sera utilisé pour des cellules qui persistent tout au long de la vie d'un organisme et sera donc synonyme de « cellule souche adulte ».

Chez les mammifères, il existe trois types de cellules progénitrices/souches neurales : les cellules neuroépithéliales, les cellules de glie radiaire et les astrocytes de type B. Ils diffèrent en termes de localisation, de mode de division et de marqueurs moléculaires et dérivent les uns des autres au cours du développement cortical (**figure 2**).

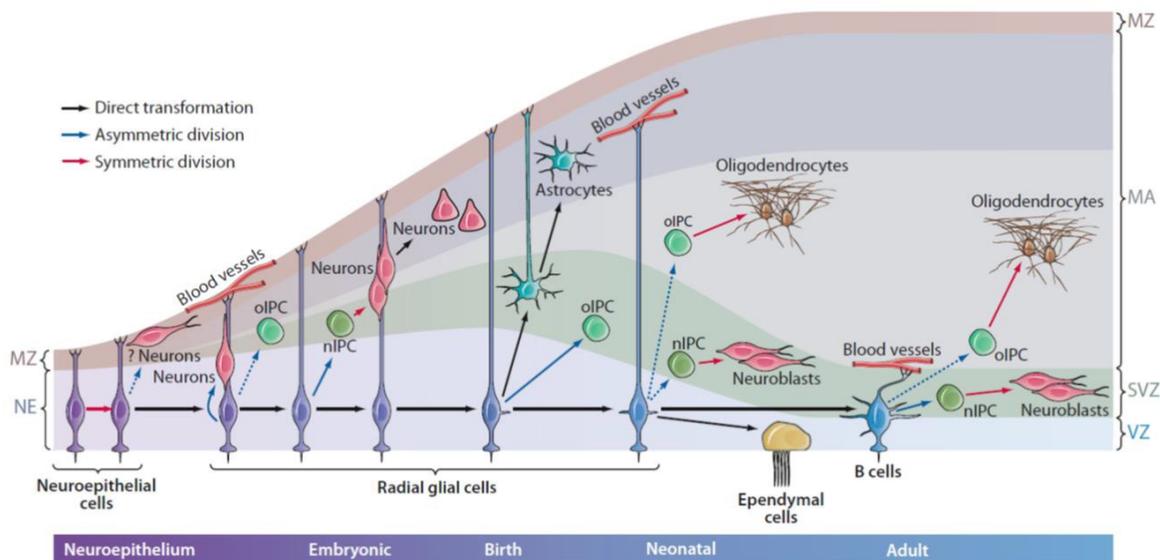


Figure 2 : Les cellules progénitrices neurales dérivent les unes des autres au cours du développement cortical chez les mammifères. De Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009.

IPC : intermediate progenitor cell, MA : mantle, MZ : marginal zone, NE : neuroepithelium, nIPC : neuronal intermediate progenitor cell, oIPC : oligodendrocytic intermediate progenitor cell, RG : radial glia, SVZ : subventricular zone, VZ : ventricular zone.

Le tube neural est constitué d'une seule couche de cellules, appelées cellules neuroépithéliales (NECs, neuroepithelial cells), qui sont le premier type de progéniteur neural. Les NECs sont

allongées et en contact avec les surfaces ventriculaire (côté apical) et piale (côté basal). Ces cellules se divisent de manière symétrique pour accroître le neuroépithélium et peuvent également générer quelques neurones. Au début de la neurogenèse, les NECs changent d'identité et se transforment en cellules de glie radiale (RGCs, radial glial cells) qui contribuent à la neurogenèse jusqu'à la naissance. Ce second type de progéniteur neural se divise de manière asymétrique pour générer une nouvelle RGC et un neurone de manière directe ou indirecte via un progéniteur intermédiaire (nIPC, neuronal intermediate progenitor cell). Les RGCs produisent également des précurseurs d'oligodendrocytes (oIPC, oligodendrocytic intermediate progenitor cell) qui peuvent, après la naissance, se transformer directement en oligodendrocytes. Les nouveaux neurones générés migrent le long de fibres radiales jusqu'aux couches extérieures du cortex alors que les RGCs restent dans la zone ventriculaire. Après la naissance, les RGCs peuvent produire des neurones, des cellules épendymaires, ou des cellules astrocytaires de type B, qui continuent à fonctionner comme des cellules progénitrices neurales, c'est-à-dire qu'elles peuvent générer des neurones et des oligodendrocytes via des progéniteurs intermédiaires. Les cellules astrocytaires de type B (troisième type de cellule souche neurale) maintiennent une organisation épithéliale avec un contact apical au ventricule et basal avec des vaisseaux sanguins (Götz and Huttner, 2005; Götz et al., 2015; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Temple, 2001).

La **figure 3** résume les différents marqueurs moléculaires exprimés par les cellules progénitrices/souches neurales.

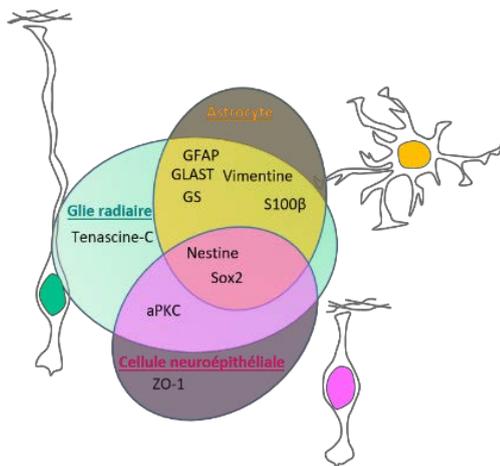


Figure 3 : Similitudes et différences entre les trois types de cellules progénitrices/souches neurales en matière de certains marqueurs moléculaires.

Adapté de Götz and Huttner, 2005 et Than-Trong and Bally-Cuif, 2015.

a- Les cellules neuroépithéliales

Les cellules neuroépithéliales sont polarisées selon l'axe apico-basal. Elles établissent des jonctions adhérentes entre elles à leur extrémité la plus apicale. Des marqueurs de jonctions

serrées (comme zonula occludens-1, ZO-1) sont également exprimés dans ce domaine. Le domaine apical des NECs contient des protéines et des lipides qui sont distincts de ceux présents dans le domaine basolatéral. Il joue un rôle important dans le destin cellulaire au cours de la division cellulaire. A la fois la surexpression et la suppression des protéines du complexe PAR (Par3 (partitioning defective protein-3), Par6 et aPKC (atypical protein kinase C)) induisent des divisions symétriques prolifératives au détriment de divisions asymétriques neurogéniques dans différents types cellulaires ou organismes modèles (Willardsen and Link, 2011). Une des caractéristiques majeures du domaine apical des NECs est la présence d'un cil primaire. C'est une structure microtubulaire dynamique qui se forme et se résorbe au cours du cycle cellulaire grâce au transport intraflagellaire (Seeley and Nachury, 2010).

Pendant le cycle cellulaire, les noyaux des NECs effectuent un mouvement apico-basal, appelé migration nucléaire intercinétique (INM, interkinetic nuclear migration) (**figure 4**) ; les noyaux étant situés à des distances variables de la surface apicale selon la phase du cycle dans laquelle se trouve chaque cellule, les NECs forment un épithélium dit pseudostratifié (Taverna and Huttner, 2010).

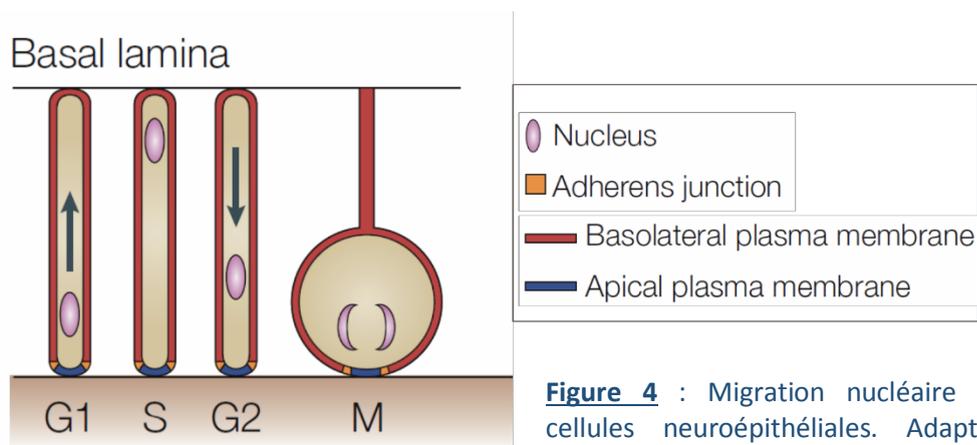


Figure 4 : Migration nucléaire intercinétique des cellules neuroépithéliales. Adapté de Götz and Huttner, 2005.

Au cours de la phase M, le noyau est localisé dans la région la plus apicale. Il migre au cours de la phase G1 vers le côté basal où s'effectue la phase S et revient rapidement vers la surface apicale en phase G2 pour entrer de nouveau en phase M. Bien que ce phénomène migratoire ait été décrit pour la première fois il y a plus de 80 ans (Sauer, 1935), son rôle a été pendant longtemps non compris. Ce n'est que récemment, qu'il a été montré que ce mouvement participerait au contrôle du destin cellulaire des progéniteurs en exposant leur noyau à différents signaux (Taverna and Huttner, 2010). Par exemple, lors du développement de la rétine chez le poisson zèbre, la signalisation Notch, connue pour maintenir les progéniteurs dans un état

quiescent, est majoritairement localisée du côté apical du neuro-épithélium et régule les cibles nucléaires lors de la migration apicale des noyaux des progéniteurs (Del Bene et al., 2008).

b- Les cellules de glie radiaires

Pendant leur prolifération et leur progression dans l'embryogenèse, les NECs vont subir un ensemble de modifications géniques et cytologiques (Malatesta et al., 2008) et se différencier en cellules de glie radiaire, aux stades embryonnaires E9/E10 chez la souris (**figure 2**). Les RGCs acquièrent une morphologie radiaire avec leur corps cellulaire localisé le long de la zone ventriculaire. Des granules de glycogène, caractéristique des astrocytes en microscopie électronique, s'accumulent dans leur cytoplasme (Choi, 1981). Les RGCs commencent à exprimer des marqueurs spécifiques des astrocytes comme le transporteur de glutamate GLAST, la sous unité β de la protéine de liaison au calcium S100 β , la BLBP (brain lipid binding protein), la ténascine C et l'enzyme glutamine synthétase (GS) (Pinto and Götz, 2007) (**figure 3**). Ils expriment une variété de protéines des filaments intermédiaires comme la vimentine et chez certaines espèces, mais pas chez les rongeurs, une protéine de filament intermédiaire astroglial appelée GFAP (glial fibrillary acidic protein ; Mori et al., 2005). A ce stade, les NECs perdent leurs jonctions intercellulaires, mais pas leurs jonctions adhérentes (Aaku-Saraste et al., 1996). De plus, les cellules commencent à établir des contacts avec des cellules endothéliales de la vascularisation cérébrale en développement.

Ces changements marquent la transition des NECs en RGCs, cependant cette transition n'est pas abrupte. Les RGCs conservent des caractéristiques de cellules neuroépithéliales comme l'expression de la protéine du filament intermédiaire nestine et les antigènes pour RC1 et RC2 (Radial glial cell marker-1 et-2), la polarité apico-basale, la présence de jonctions adhérentes, le cil primaire à la surface apicale et la migration nucléaire intercinétique (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Toutefois, l'INM est différente de celle des NECs. En effet, le noyau ne migre pas sur toute la longueur de l'axe apico-basal mais ses mouvements sont confinés à la portion de cellule entre la surface apicale et la limite basale de la zone ventriculaire ou sous-ventriculaire (Götz and Huttner, 2005).

Chez les mammifères, les populations de RGCs sont hétérogènes aussi bien aux niveaux moléculaires et fonctionnels qu'au niveau régional. D'un point de vue moléculaire, toutes les RGCs n'expriment pas le même ensemble de marqueurs. Par exemple, pendant la neurogénèse corticale chez la souris (E8-E12), certaines cellules gliales n'expriment que RC2, d'autres RC2/GLAST ou RC2/BLBP et d'autres encore co-expriment ces trois marqueurs (Pinto and

Götz, 2007). De plus, certaines cellules gliales ne présentent qu'une activité gliogénique alors que d'autres, moins nombreuses, sont multipotentes et sont capables à la fois de générer des neurones et des cellules gliales. Il est suggéré que la combinaison de marqueurs exprimés par les cellules gliales radiaires pourrait être corrélée à leur capacité gliogénique et/ou neurogénique. Ainsi, il semblerait que les RGCs BLBP-positives soient plus largement pluripotentes que celles qui n'expriment pas cette protéine. La BLPB, régulée par Notch, permet de maintenir le phénotype cellule gliale radiaire. La diminution ou le blocage de cette protéine conduit à la perte de polarité de ces cellules (Anthony et al., 2005).

A la fin de la période de développement embryonnaire, de nombreuses RGCs perdent leur lien avec le ventricule et migrent vers le parenchyme où leur prolongement radiaire régresse. Ces RGCs adoptent une morphologie mutipolaire dite étoilée, caractéristique des astrocytes. Les astrocytes dans le parenchyme sont quiescentes dans le cerveau adulte (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

2. La neurogenèse adulte

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont décrit une neurogenèse active et une plasticité fonctionnelle dans le cerveau adulte chez un grand nombre d'animaux (Dewulf and Bottjer, 2005; Goldman and Nottebohm, 1983; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Zupanc and Horschke, 1995; Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999; Kornack and Rakic, 1999; Pencea et al., 2001; Zupanc and Sîrbulescu, 2011). Les populations de cellules souches adultes diffèrent en matière de distribution et de composition dans les cerveaux des différents groupes de vertébrés et même entre différentes régions neurogéniques chez une même espèce (Lindsey and Tropepe, 2006; Grandel and Brand, 2013). Le cerveau des mammifères adultes a une capacité de neurogenèse assez limitée. Les oiseaux et les reptiles ont une capacité à générer de nouveaux neurones à l'âge adulte un peu plus importante. Toutefois la classe de vertébrés présentant la neurogenèse adulte la plus remarquable à ce jour est celle des poissons téléostéens (**figure 5**).

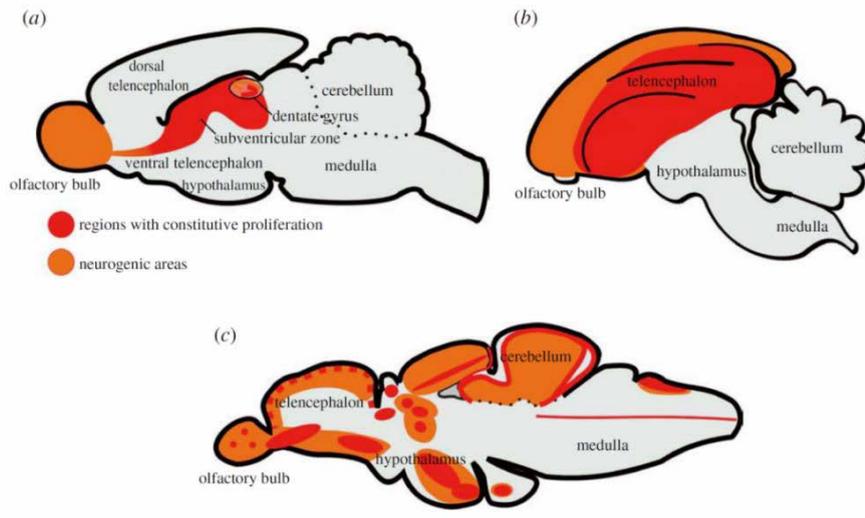


Figure 5 : Représentations schématiques des niches neurogéniques et des zones de prolifération constitutive dans le cerveau de vertébrés adultes. (a) Rongeur (souris), (b) Oiseau (canari), (c) Poisson (poisson zèbre). De Kaslin et al., 2008.

D'un point de vue comparatif, il est intéressant de noter que la neurogenèse adulte a été également découverte chez une raie, *Dasyatis sabina* (Leonard et al., 1978). Comme les raies et les requins constituent le taxon frère de tous les poissons osseux et tétrapodes (les ostéichthyens), cette découverte montre que la neurogenèse adulte est une caractéristique phylogénétique des vertébrés gnathostomes, qui était présente avant la scission entre ostéichthyens et chondrichthyens (dont font partie les raies et les requins) (Grandel and Brand, 2013).

2.1 La neurogenèse adulte chez les mammifères

Chez les mammifères, les cellules souches adultes sont localisées uniquement dans le télencéphale, au niveau de la zone sous-granulaire (SGZ, subgranular zone) du gyrus denté de l'hippocampe et au niveau de la zone sous-ventriculaire/sous-épendymaire (SVZ, subventricular zone), située sous la paroi des ventricules télencéphaliques latéraux. Ces cellules souches neurales ont majoritairement des caractéristiques de cellules de glie radiaire et sont maintenues au sein d'un microenvironnement spécialisé, appelés niche, susceptible de réguler leur comportement et incluant d'autres types cellulaires.

a. La zone sous-ventriculaire du ventricule latéral

La SVZ dérive directement de la zone ventriculaire embryonnaire. Chez les rongeurs, la SVZ est la région cérébrale où l'activité neurogénique est la plus élevée. Environ 30 000 nouveaux neurones immatures, les neuroblastes, se forment chaque jour à partir des progéniteurs neuraux. Quatre types cellulaires ont été identifiés dans cette niche : les cellules de type A (neuroblastes

en prolifération, exprimant une molécule d'adhésion cellulaire PSA-NCAM (polysialilated-neural cell adhesion molecule)), les cellules de type B qui sont les cellules souches neurales (Doetsch et al., 1999) (astrocytes exprimant GFAP, Nestine, Vimentine et GLAST), les cellules de type C (progéniteurs transitoires) et les cellules de type E (cellules épendymaires) qui sont des cellules ciliées faisant face à la lumière du ventricule et dont une des fonctions est de faire circuler le liquide cérébrospinal (**figure 6A**).

Les cellules de type B sont des cellules astrocytaires qui, par leur morphologie, peuvent être divisées en cellules de type B1 et B2. Les cellules de type B1 sont en contact étroit avec la couche épendymaire via à la fois des interstices et des jonctions adhérentes et ont un cil primaire qui atteint la lumière ventriculaire. Au niveau de la surface ventriculaire, les extrémités apicales des cellules B1 sont entourées de cellules épendymaires formant une structure en « rosette », spécifique aux régions neurogéniques adultes (**figure 6B**). Les cellules de types B2 sont localisées seulement dans le parenchyme au côté des cellules de type A.

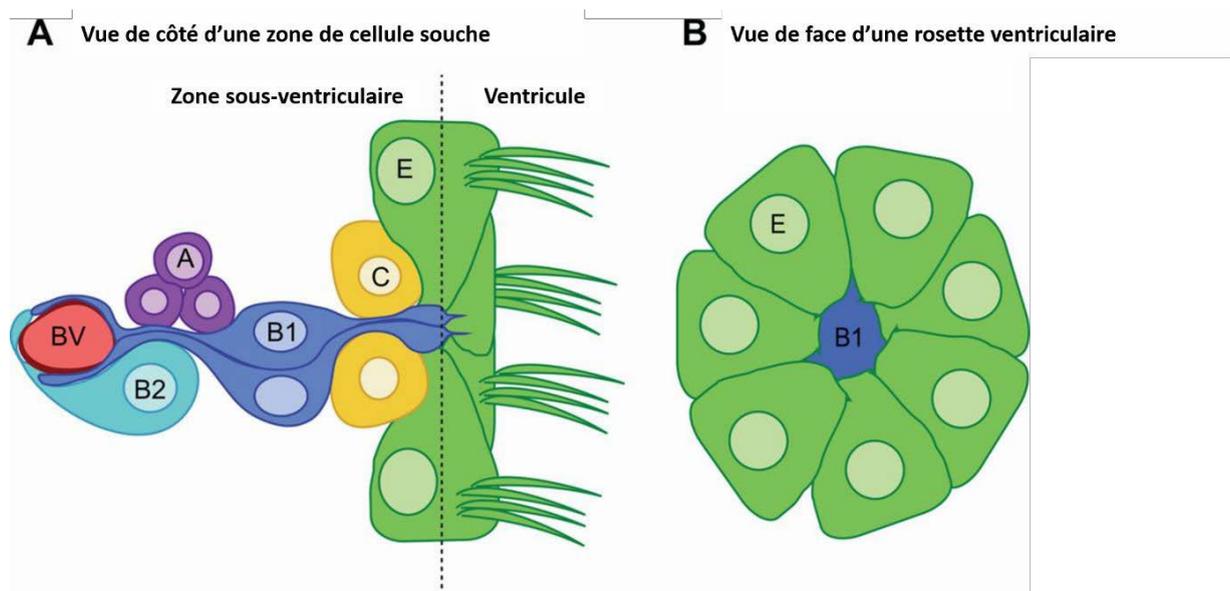


Figure 6 : Types cellulaires et organisation de la niche neurogénique de la SVZ. Adapté de Harding et al., 2014.

A - La niche de cellules souches de la SVZ est composée de cellules épendymaires (type E) et de cellules souches astrocytaires (B1 et B2), qui dans le cas des cellules B1 s'allongent de l'espace ventriculaire à l'espace sous-ventriculaire et sont en contact avec les vaisseaux sanguins (BV). Les cellules de type B1 et B2 donnent naissance aux progéniteurs de type C et A, qui à leur tour donneront des neurones et des cellules gliales.

B - Vue de face du mur ventriculaire latéral montrant l'arrangement en « rosette » des cellules épendymaires autour des extrémités apicales des cellules de type B1.

Les cellules de type B se divisent lentement et génèrent des progéniteurs intermédiaires, les cellules de type C, qui à leur tour donnent des neuroblastes (cellules de type A). Ces

neuroblastes migrent vers les bulbes olfactifs, suivant un flux migratoire rostral (RMS, rostral migratory stream) (**figure 7**).

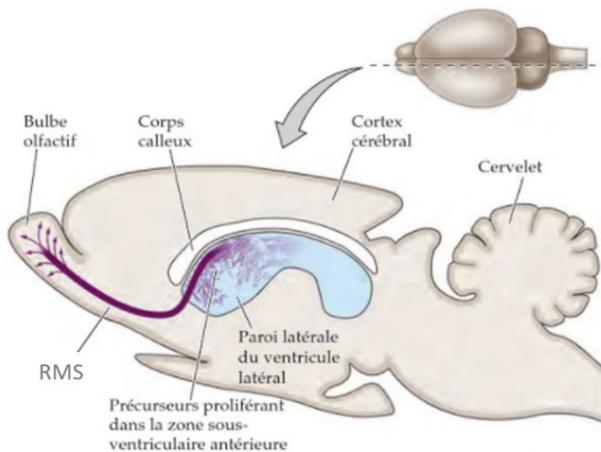


Figure 7 : Neurogenèse au niveau de la SVZ de mammifères adultes. Adapté de Purves et al., 2015.

RMS : Rostral Migratory Stream

La longue distance de migration des neuroblastes est parcourue grâce à des structures tubulaires formées par des astrocytes spécialisés (Lois et al., 1996). Une fois arrivés dans les bulbes olfactifs, les neuroblastes migrent de manière radiaire majoritairement vers les couches de cellules granulaires et dans une plus faible proportion vers les couches périglomérulaires où ils se différencient en interneurons GABAergiques (environ 93%) ou dopaminegiques (près de 5%). Un examen quantitatif du taux de survie des neuroblastes révèle que près de 50% d'entre eux sont éliminés quelques semaines après leur arrivée (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). La raison pour laquelle certains neurones meurent précocement est encore matière à spéculation. Elle pourrait être liée au fait que seuls les neurones intégrant le réseau neuronal pour encoder de nouvelles informations survivent. Plusieurs travaux ont montré que l'apprentissage de nouvelles odeurs augmente la survie des nouveaux neurones (Yamaguchi and Mori, 2005; Alonso et al., 2006).

L'intégration continue de nouveaux neurones pourrait jouer un rôle dans le codage de nouvelles odeurs. Le volume du bulbe olfactif n'augmentant pas durant la vie adulte, il existe un mécanisme de sélection capable de supprimer les neurones non utilisés et de sélectionner parmi les nouveaux neurones seulement ceux qui s'intègrent durant le codage d'une nouvelle odeur (Imayoshi et al., 2009).

En plus des cellules sous-épendymaires de type B, certains auteurs ont présenté des données suggérant que les cellules épendymaires de type E seraient aussi des cellules souches neurales (Johansson et al., 1999). Cette idée n'est pas communément acceptée car d'autres travaux ont montré (1) que les cellules épendymaires peuvent proliférer *in vitro* mais ne génèrent pas de neurones (Chiasson et al., 1999), (2) que ces cellules ne prolifèrent pas *in vivo* et que les seules

cellules en prolifération et en contact avec le ventricule sont les cellules de type B (Spassky et al., 2005).

b. La zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe

Le gyrus denté est une sous-structure de l'hippocampe qui intervient dans les mécanismes de mémorisation et de repérage spatial. C'est une zone où la prolifération cellulaire est plus réduite. En effet, seulement 3000 à 9000 neurones sont formés chaque jour chez les rongeurs, en fonction de l'âge. Les cellules souches de la SGZ sont également des astrocytes (cellules de type B) qui génèrent des progéniteurs intermédiaires, les cellules de type D. Ces cellules migrent vers la zone granulaire voisine où elles se différencient majoritairement en neurones granulaires (Seri et al., 2001) (**figure 8**). Contrairement aux neuroblastes générés dans la SVZ, les neuroblastes migrent sur une courte distance qui les conduit de la SGZ à la zone granulaire (quelques dizaines de micromètres). Environ 50% des cellules nouvellement produites dans le gyrus denté meurent dans les trois semaines suivantes, le volume du gyrus denté restant constant (Dayer et al., 2003). Les autres reçoivent dans un premier temps des contacts synaptiques GABAergiques, puis glutamanergiques.

La neurogenèse continue au sein de l'hippocampe pourrait avoir un rôle de support nécessaire aux codages de nouvelles informations et ainsi participer à la plasticité de cette structure.

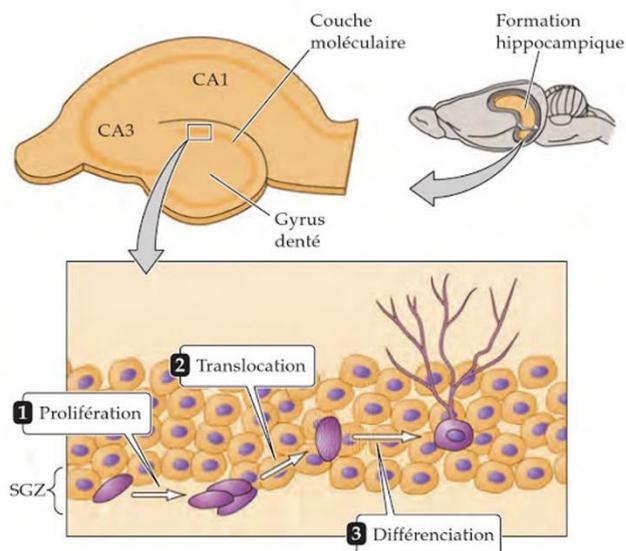


Figure 8: Neurogenèse au niveau de la SGZ de mammifères adultes. Adapté de Purves et al., 2015.

Des travaux ont mis en évidence de nouvelles zones de neurogenèse constitutive, comme le cortex ou l'hypothalamus. Néanmoins, l'activité neurogénique de ces régions reste discrète en comparaison de la SVZ et de la SGZ (Abrous et al., 2005).

2.2 La neurogenèse adulte chez les poissons téléostéens

Chez les téléostéens, entre 12 et 16 zones de prolifération cellulaire ont été décrites (**figure 5-C**) chez différentes espèces comme l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), le poisson électrique *Apteronotus leptorhynchus*, le poisson zèbre (*Danio rerio*), le médaka (*Oryzias latipes*) et le killi (*Nothobranchius furzeri*) (Grandel and Brand, 2013). Ces zones de neurogenèse ne sont pas restreintes uniquement au cerveau antérieur comme chez les mammifères mais sont présentes tout le long de l'axe antéro-postérieur du cerveau. La découverte que les cellules de glie radiaire sont les progéniteurs neuraux au cours du développement chez la souris (Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2002; Malatesta et al., 2003; Anthony et al., 2004) et que le potentiel de cellule souche est maintenu par les cellules gliales dans le cerveau des rongeurs a suggéré fortement que des RGCs adultes pourraient être à l'origine de la neurogenèse étendue observée chez les poissons téléostéens adultes. Des travaux explorant cette possibilité chez le poisson zèbre adulte ont confirmé cette hypothèse. Les RGCs sont directement impliquées dans la neurogenèse constitutive de certaines de ces régions : le pallium, le sous-pallium et l'hypothalamus. Toutefois ces cellules ne sont pas de type astrocytaire comme chez les mammifères car à l'exception du nerf optique (Koke et al., 2010), le cerveau de poisson zèbre en est dépourvu (Grupp et al., 2010). De plus, les RGCs ne sont pas le seul type de cellule souche neurale présent dans le système nerveux central des poissons téléostéens adultes, des populations de cellules neuroépithéliales sont maintenues jusqu'à cet âge. En particulier, des NECs ont été identifiées dans le cervelet du poisson zèbre et dans le système visuel des poissons où elles contribuent à la neurogenèse tout au long de la vie de la rétine et du toit optique. Dans la suite de cette partie, je décris de manière non exhaustive certaines de ces régions neurogéniques.

a. Les progéniteurs de type glie radiaire

Chez le poisson zèbre, deux zones distinctes de neurogenèse sont présentes dans le télencéphale : une zone de prolifération ventrale le long de la surface ventriculaire du sous-pallium et une zone de prolifération dorsale le long de la surface ventriculaire du pallium (Byrd and Brunjes, 1998; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Comme aucune couche de cellules épendymaires n'est présente dans cette région du cerveau, les cellules souches neurales bordent directement le ventricule. Ces cellules présentent des caractéristiques de cellules de glie radiaire et expriment des marqueurs comme GFAP, BLBP ou GS, impliqués dans la fonction gliale de ces cellules. Elles sont principalement quiescentes mais peuvent produire des neuroblastes, qui vont à leur tour générer de nouveaux

neurones. Des expériences de lignage cellulaire ont montré que des RGCs du télencéphale dorsal génèrent des neurones matures via des divisions asymétriques, faisant de ces cellules des cellules souches (Rothenaigner et al., 2011). De plus, ces RGCs expriment le récepteur notch3, qui est nécessaire au maintien de la quiescence des RGCs dans le télencéphale de poisson zèbre (Alunni et al., 2013)

Les neurones nouvellement générés sont essentiellement positifs à la parvalbumine et à la calbindine, et sont respectivement concentrés dans le pallium central/latéral et pallium médial. De plus, quelques neurones GABAergiques et glutamatergiques sont dispersés à travers tout le pallium (von Trotha et al., 2014). Il est possible qu'il existe différents processus d'intégration de ces nouveaux neurones dans le pallium chez le poisson zèbre adulte où peu de mort cellulaire est observée et où la neurogenèse adulte est associée avec une croissance de la région (Than-Trong and Bally-Cuif, 2015).

Au niveau du sous-pallium, les RGCs génèrent des progéniteurs qui se différencient majoritairement en neurones GABAergiques et dopaminergiques et migrent vers le parenchyme. Les RGCs génèrent également des progéniteurs qui migrent vers les bulbes olfactifs et se différencient en neurones GABAergiques dans une situation comparable aux mammifères (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). La migration des progéniteurs vers le bulbe olfactif est rendue possible grâce à un courant migratoire équivalent à celui des mammifères si ce n'est qu'il diffère par l'absence de guides de migration gliales (Than-Trong and Bally-Cuif, 2015).

b. Les progéniteurs de type neuroépithélial

Une particularité notable de la neurogenèse adulte des poissons téléostéens est la présence de progéniteurs conservant des caractéristiques de NECs dans certaines zones neurogéniques (Dambroise et al., 2017).

Une des populations de progéniteurs les mieux décrites est celle présente au niveau du récessus cérébelleux. Dans cette niche, les progéniteurs neuraux sont polarisés, expriment les marqueurs de cellules souches *nestine*, *sox2*, *meis* et *musashi* mais n'expriment pas de marqueurs de glie radiaire (Kaslin et al., 2009). Ces NECs donnent naissance à des progéniteurs intermédiaires qui migrent vers la couche de cellules granulaires où ils se différencient en cellules granulaires (Kaslin et al., 2013).

La composition de la niche du sous pallium reste assez confuse. En effet, cette niche contient, en plus des RGCs décrites précédemment, des progéniteurs avec des caractéristiques neuroépithéliales (polarité apico-basale, INM, absence de marqueurs de glie radiaire). Cette population de cellules est également positive à la nestine (Ganz et al., 2010).

Plus récemment, des expériences de lignage cellulaire ont mis en évidence dans le télencéphale dorsal adulte, une petite population de cellules neuroépithéliales maintenue depuis les stades embryonnaires. Ces progéniteurs sont capables de générer des cellules de glie radiaire chez l'adulte (Dirian et al., 2014).

Au niveau du système visuel des poissons téléostéens, des progéniteurs aux caractéristiques neuroépithéliales ont également été identifiés. Le pool de progéniteurs présent au niveau du TO sera décrit plus en détail dans la partie suivante. Dans la rétine de poisson zèbre, des cellules prolifératives négatives pour des marqueurs gliaux comme GFAP mais positives pour des marqueurs de cellules souches (nestine, BLBP, sox2) sont présentes dans la zone marginale ciliaire (CMZ, ciliary marginal zone), à l'interface entre la rétine et l'épithélium ciliaire (Raymond et al., 2006). Chez le médaka, le lignage de cellules de la CMZ montre qu'elle contient des cellules souches multipotentes capables de générer tous les types neuronaux de la rétine ainsi que la glie de Müller (Centanin et al., 2011, 2014). Il est intéressant de noter que la contribution de ces progéniteurs à la neurogenèse constitutive se fait par voie directe, c'est-à-dire sans passer par un stade glie radiaire.

II – Le toit optique

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes de régénération neuronale au niveau du toit optique du poisson zèbre. Dans cette partie, je décris de manière détaillée l'anatomie, l'origine embryonnaire, le mode de croissance et la neurogenèse adulte du TO.

1. Description anatomique et organisation du toit optique

Le TO ou tectum est un important centre de traitement des informations sensorielles, principalement visuelles, mais également somatosensorielles qui permet d'initier les réponses comportementales appropriées. Le TO coordonne les mouvements saccadiques des yeux (Roeser and Baier, 2003) et régule les fonctions motrices de prises de proie (Gahtan et al., 2005) et de comportements d'évitement chez la grenouille (Dong et al., 2009) et chez le poisson (Del Bene et al., 2010).

Le TO est une structure dorsale paire du mésencéphale (cerveau moyen) des vertébrés, appelé colliculus supérieur chez les mammifères. Chez tous les poissons téléostéens, le TO est formé de deux lobes symétriques de chaque côté du cerveau (**figure 9**).

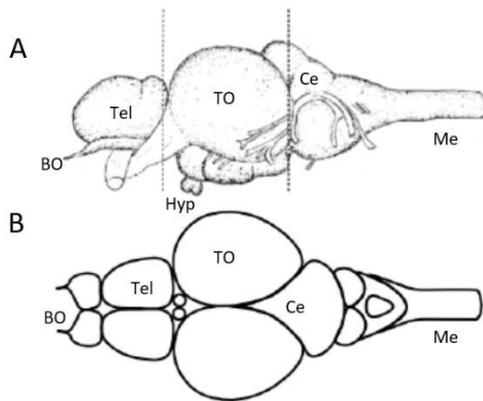


Figure 9 : Dessins en vue latérale (A) et dorsale (B) d'un cerveau adulte de médaka.

Les traits pointillés délimitent de gauche à droite le télencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Le TO est la structure constituée de deux lobes au niveau du mésencéphale. Adapté de Nguyen et al., 1999.

Bo : bulbe olfactif, Ce : cervelet, Hyp : hypothalamus, Me : moelle épinière, Tel : télencéphale, TO : toit optique

La taille du tectum et sa complexité peuvent varier en fonction de leur comportement et de leur niche écologique. Les espèces qui traitent le plus d'informations visuelles ont des tecta plus larges (Ito et al., 2007). Il existe même des différences de taille entre populations d'une même espèce. Le TO est réduit chez la population cavernicole de *Poecilia mexicana*, petit poisson tropical vivant dans une complète obscurité, comparé à la population de rivière (Eifert et al. 2014).

Les poissons possèdent une structure associée au tectum, le torus longitudinalis, qui est absente chez les autres vertébrés. Il s'agit d'une extension rostro-caudale du TO le long de la ligne médiane qui reçoit des fibres afférentes relayées par le télencéphale et qui se projettent ensuite dans le tectum.

Le TO est une structure corticale c'est-à-dire que les éléments cellulaires sont organisés en couches. La zone périventriculaire grise (PGZ, periventricular grey zone), aussi appelée *stratum periventriculare* (SPV) contient les corps cellulaires de la majorité des neurones tectaux appelés neurones périventriculaires (PVNs, periventricular neurons)(Corbo et al., 2012) et de cellules de glie radiaire ventriculaires. Elle est la couche la plus profonde du TO et est recouverte d'un neuropile synaptique qui comprend les axones et les dendrites des PVNs ainsi que les axones des cellules ganglionnaires de la rétine. Le neuropile est subdivisé en plusieurs couches mais leur nombre varie selon différents groupes phylogénétiques. Chez la plupart des téléostéens, la zone superficielle est divisée en *stratum opticum* (SO) et *stratum fibrosum*, la zone centrale est quant à elle divisée en *stratum fibrosum* et *griseum superficiale* (SFGS), *stratum griseum centrale* (SGC) et *stratum album centrale* (SAC). Des imprégnations de Golgi, chez le poisson

rouge adulte et chez la larve de poisson zèbre, montrent que les neurones périventriculaires n'ont qu'une branche dendritique qui s'étend à travers le neuropile, traversant souvent plusieurs couches (Meek and Schellart, 1978; Nevin et al., 2010; Robles et al., 2011; Scott and Baier, 2009) (**figure 10**).

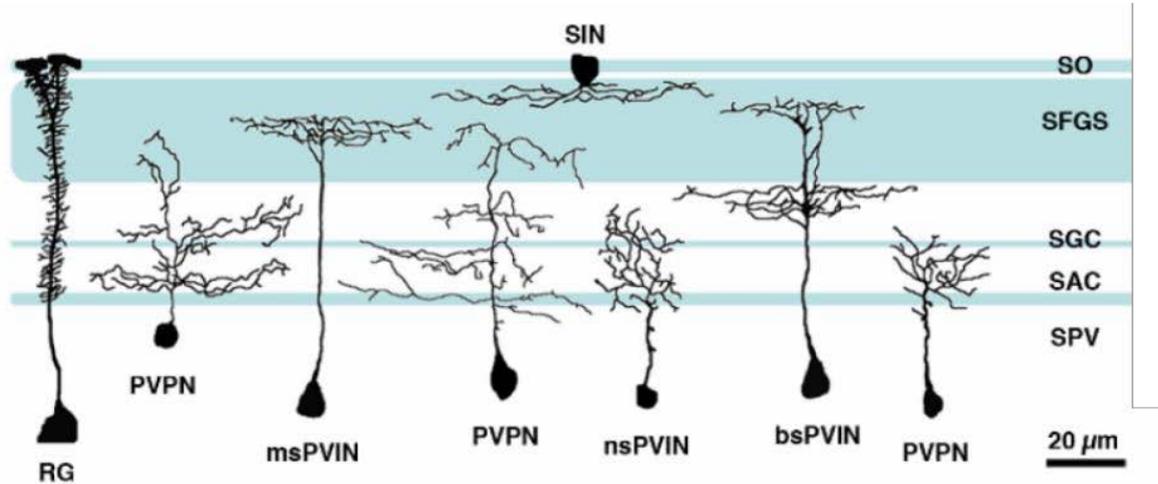


Figure 10 : Types cellulaires décrits dans le TO chez la larve de poisson zèbre par coloration de Golgi. Sont présents des glies radiales (RG, radial glia), des neurones de projection périventriculaires (PVPNs, periventricular projection neurons), des interneurones périventriculaires (PVINs, periventricular interneurons) et des interneurones superficiels (SINs, superficial interneurons). Les dendrites des PVPNs et des PVINs peuvent être de différentes morphologies. Par exemple, on peut trouver des PVINs non stratifiés (nsPVINs), mono-stratifiés (msPVINs) ou bi-stratifiés (bsPBINs). Adapté de Nevin et al., 2010.

La majorité des informations que le TO reçoit est fournie par les axones des cellules ganglionnaires de la rétine, mais il en reçoit aussi par ceux du prétectum, du thalamus dorsal et du tegmentum (Cervený et al., 2012). Les cellules ganglionnaires de la rétine projettent leurs axones du côté contralétéral du tectum (**figure 11**), principalement dans les couches superficielles du neuropile, de manière topographique, c'est-à-dire que la position de leurs projections axonales dans le tectum reflète la position de leurs corps cellulaires dans la rétine (Xiao et al., 2005).

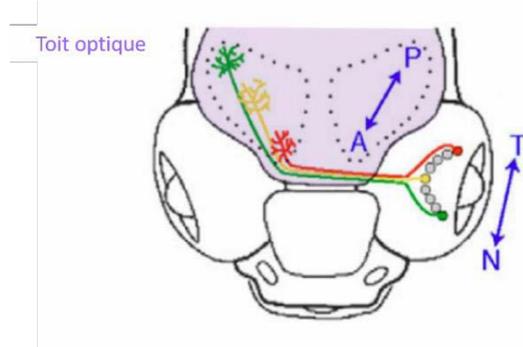


Figure 11 : Schéma du circuit visuel chez le poisson zèbre, en vue dorsale.

Les neurones de la rétine projettent dans le TO (violet), via le nerf optique. Ceux situés au pôle nasal (N) de l'œil projettent dans la partie postérieure (P) du TO. Au contraire, les neurones de la partie temporale (T) de la rétine projettent dans la partie antérieure (A) du TO. Adapté de Grove, 2008.

2. Origine embryonnaire du TO

La morphogenèse du SNC se base sur deux grands processus. D'une part la régionalisation qui confère une identité propre aux différents territoires et d'autre part la neurogenèse, qui comme nous l'avons déjà vu, permet aux cellules progénitrices de générer des cellules neurales matures et fonctionnelles (Bally-Cuif and Hammerschmidt, 2003). Au cours du développement, la coordination de ces processus est en partie permise par l'établissement au sein du tube neural de frontières organisatrices. Par l'intermédiaire de molécules de signalisation ou morphogènes, ces frontières déterminent l'identité de leurs territoires voisins. Dans le cas du TO, la MHB (midbrain hindbrain boundary), qui sépare le cerveau moyen du cerveau postérieur, joue ce rôle d'organisateur grâce, entre autres, à la voie de signalisation Fgf, en particulier au signal Fgf8 (fibroblast growth factor 8) (**figure 12A**). Les domaines d'expression d'*otx2* (homeobox domain containing transcription factors orthodenticle homologue 2) et de *gbx2* (gastrulation brain homeobox 2) sont complémentaires et permettent de positionner la frontière més-métencéphalique. La frontière entre les deux domaines d'expression est définie par l'action de molécules Wnt sécrétés par le mésoderme latéral (Cavodeassi and Houart, 2012). *Otx2* est exprimé dans le cerveau antérieur présomptif ainsi que dans le cerveau moyen tandis que *gbx2* est exprimé dans la partie antérieure du cerveau postérieur (Broccoli et al., 1999). *Meis2* régule l'expression d'*otx2* dans le cerveau moyen alors que les membres de la famille Iroquois (*Xiro*, *Iro1*, *Iro7*) régulent l'expression de *gbx2* dans le cerveau postérieur. Fgf8 affine l'interface *otx/gbx* en inhibant respectivement l'expression de *gbx2* dans le cerveau moyen et celle d'*otx2* dans le cerveau postérieur (Foucher et al., 2006). *Lrrn1* (leucine rich repeat neuronal 1) est impliqué dans la création d'une zone nette entre cerveau moyen et postérieur où aucune cellule de ces deux territoires n'est mélangée (Rapacioli et al., 2016) (**figure 12C**). La MHB est également un réservoir de cellules progénitrices de type neuroépithélial, dont le recrutement progressif assure la neurogenèse dans le mésencéphale et le rhombencéphale (**figure 12B**). Le maintien des cellules progénitrices de la MHB dépend de facteurs de transcription de type Hairy/e(Spl) (hairy/enhancer of split) : *Hes* (*Hes1/3/5*) chez la souris, *Her* (*Her5/9*) chez le poisson zèbre (Stigloher et al., 2008). *Her5* est le marqueur le plus précoce de la MHB (Tallafuss and Bally-Cuif, 2003). Les cellules *her5* positives participent à la formation du cerveau moyen et postérieur chez le poisson zèbre au stade 80% d'épibolie jusqu'à la fin de la somitogenèse (Galant et al., 2016).

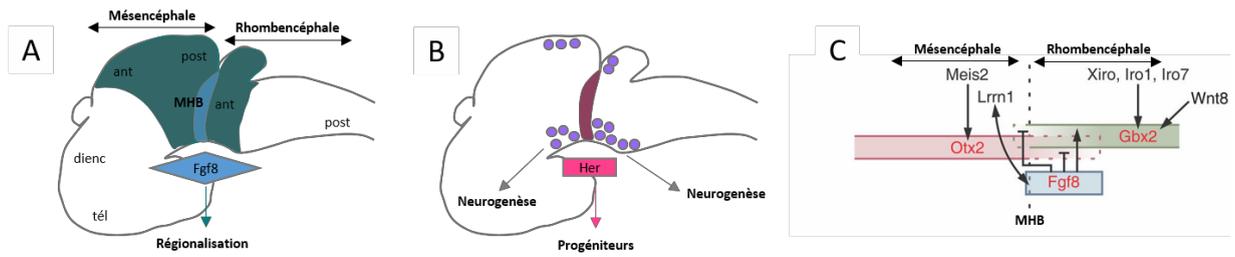


Figure 12 : Activités et positionnement de la frontière MHB.

A et B : Représentation schématique du cerveau de poisson zèbre à environ 24h de développement (vue latérale, côté antérieur vers la gauche). Adapté de Coolen et Bally-Cuif, 2008.

- A- La MHB est la source d'un gradient de Fgf8 qui régionalise le mésencéphale et le rhombencéphale antérieur selon l'axe antéro-postérieur.
- B- La MHB exprime également les facteurs Her qui inhibent la neurogenèse, permettant le maintien local de progéniteurs (rose) alors que les régions voisines se différencient en neurones (violet).
- C- La zone de superposition d'*otx2* et *gbx2* définit la MHB. A la suite de la caudalisation de la plaque neurale par *wnt8*, *otx2* est exprimé dans le futur mésencéphale et *gbx2* dans le futur rhombencéphale. L'expression d'*otx2* est régulée par *meis2*, celle de *gbx2* par les membres de la famille iroquois. *Lrrn1* va par la suite créer une démarcation nette entre les deux régions du cerveau. Adapté de Rapacioli et al., 2016.

Ant : antérieur, dienc : diencéphale, MHB : midbrain hindbrain boundary, post : postérieur, tél : télencéphale

A la fin de ce processus de régionalisation, la partie dorsale (plaque alaire) de la vésicule mésencéphalique est déterminée à former le TO et le torus semicircularis.

3. Neurogenèse adulte dans le TO

La rétine et le TO sont deux structures analogues, elles croissent tout au long de la vie des poissons téléostéens selon un mode dit de tapis roulant cellulaire (Devès and Bourrat, 2012; Joly et al., 2016) (**figure 13**). Ce mode de neurogenèse consiste en l'addition de colonnes de cellules à la périphérie dans une zone proliférative appelée zone marginale tectale (TMZ, tectal marginal zone) (Joly et al., 2016) ou zone proliférative tectale (TPZ, tectal proliferative zone) (Galant et al., 2016). Les cellules différenciées sont localisées dans la partie la plus antérieure et centrale de chaque lobe du TO. Il existe donc un gradient de différenciation de la zone de prolifération à la marge du tectum vers la zone plus centrale de cellules différenciées.

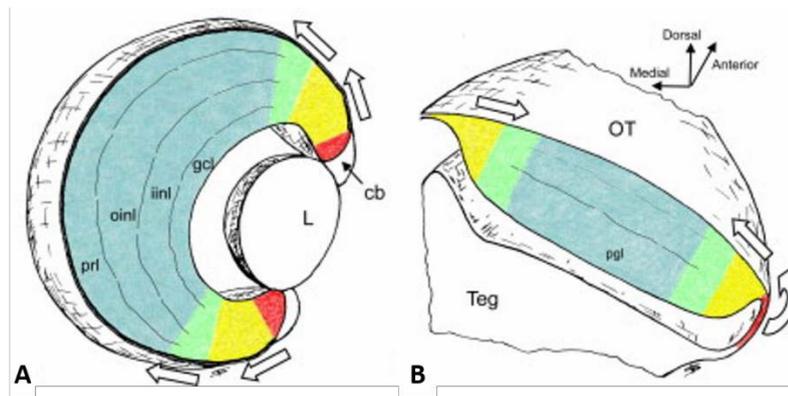


Figure 13 : Représentation schématique de deux exemples de tapis roulants cellulaires. Adapté de Devès and Bourrat, 2012.

A Rétine de poisson téléostéen ou de grenouille.

B TO de poisson téléostéen.

Les zones de cellules progénitrices à division lente sont en rouge, les zones de progéniteurs se divisant rapidement sont en jaune, les zones où les cellules sortent du cycle cellulaire sont en vert et les cellules différenciées sont en bleu. Les flèches blanches indiquent la direction des mouvements du tapis cellulaire roulant.

Cb : ciliary body, gcl : ganglion cell layer, iinl : inner part of the inner nuclear layer, L : lens, oinl : outer part of the inner nuclear layer, OT : optic tectum, pgl : periventricular grey layer, prl : photoreceptor layer, Tcg : tegmentum

En réalisant des expériences d'incorporation de BrdU, Grandel et al. ont marqué une région qui a été nommée PML (posterior mesencephalic lamina/peripheral midbrain layer) (Grandel et al., 2006). Cette fine couche de cellules fait la jonction entre : dorsalement la marge proliférative du tectum, et ventralement la zone proliférative du torus semicirculaire ou zone de prolifération de l'isthme (IPZ, isthmic proliferative zone) (**figure 14A**). Les cellules de la PML contribuent à la formation du TO et du torus semicircularis chez l'embryon (Recher et al., 2013). Elles ont été caractérisées chez le poisson zèbre (Ito et al., 2010) et chez le médaka (Alunni et al., 2010) comme des cellules progénitrices neuroépithéliales. Ce sont des cellules à division lente avec une polarité apico-basale qui expriment des marqueurs de cellules souches comme *sox2* ou *musashi1* mais qui n'expriment pas de marqueurs de glie radiaire. Chez le poisson zèbre, ces cellules donnent naissance à des neurones GABAergiques et glutamatergiques, des RGCs et des oligodendrocytes (Ito et al., 2010). Chez le médaka et le poisson zèbre, ces nouveaux neurones peuvent être localisés dans toutes les couches du TO même si la majorité de ces neurones reste dans la PGZ (Nguyen et al., 1999; Grandel et al., 2006). Il a été montré par des expériences d'hybridation *in situ* fluorescente, que les cellules de la PML expriment trois récepteurs notch (*notch1a*, *1b*, *3*) (de Oliveira-Carlos et al., 2013) ce qui est intéressant car la voie de signalisation Notch est impliquée dans le maintien des progéniteurs neuraux (Chapouton et al., 2010; Alunni et al., 2013). Quelques cellules de la PML expriment le facteur de transcription *her5* (orthologue du gène *Her7* des mammifères) et

prolifèrent peu (Chapouton et al., 2006). Galant et al. ont montré que la population de cellules *her5*, présente au niveau de la MHB chez le poisson zèbre post-embryonnaire, est à l'origine de la PML adulte et construit progressivement le TO de manière antéro-postérieure (Galant et al., 2016). Les cellules positives à *her5* sont le pool de progéniteurs le plus en amont et qui est à l'origine des cellules de la TPZ. Les cellules de la TPZ génèrent des cellules de glie radiaire exprimant *her4* qui produisent transitoirement des neurones (voie indirecte). Plus rarement les cellules de la TPZ participent directement à la neurogenèse tectale (**figure 14B**).

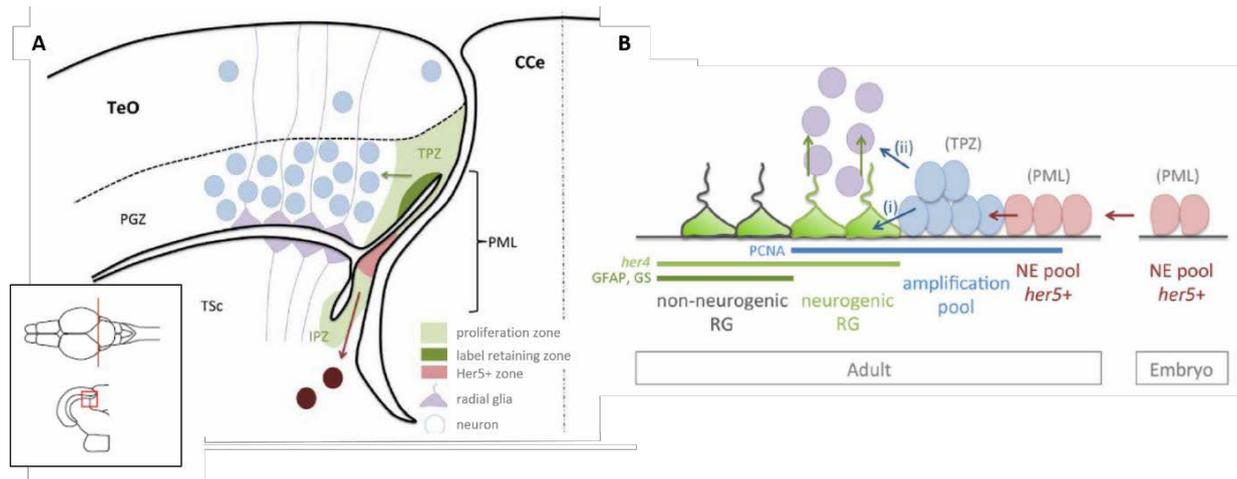


Figure 14 : Les cellules *her5* positives de la PML à l'origine de l'activité neurogénique chez l'adulte. Adapté de Galant et al., 2016.

- A- Représentation schématique d'une section transverse d'un hémisphère du TO de poisson zèbre adulte montrant les différentes populations cellulaires. Les flèches indiquent les lignages. Flèche verte : génération des neurones et des glies radiaires de la PGZ par les progéniteurs en prolifération de la TPZ, flèche rouge : génération de cellules du tegmentum par les cellules *her5* de la PML.
- B- Représentation schématique de la séquence neurogénique du TO. Les voies directe (i) et directe (ii) de neurogenèse du TO sont indiquées. Le territoire du TO maintient une population de NECs héritée d'un pool de NECs embryonnaires exprimant *her5* et qui sert de source de RGCs. Les RGCs sont transitoirement neurogéniques dans le TO.

Cc : *crista cerebellaris*, IPZ : isthmus proliferation zone, PGZ : periventricular grey zone, PML : peripheral midbrain layer/posterior mesencephalic lamina TeO : *tectum opticum*, TPZ : tectal proliferation zone, TSc *torus semicircularis*.

Si les grands principes du développement et de la neurogenèse adulte dans le TO commencent à être documentés, il n'existe à ce jour aucune étude détaillée de lignage cellulaire de progéniteur isolé qui permette de décrire les types de division cellulaire ou les différentes potentialités existantes au sein du pool de progéniteur. Une raison à cela est le manque d'outils génétique qui rendraient possible ce type d'expérience. Par ailleurs, il n'existe pas de données récentes sur les capacités régénératives du TO qui constitue l'objet de mon travail de thèse. Dans le chapitre qui suit j'introduirai la neurogenèse en contexte de régénération.

CHAPITRE 2 : NEUROGENESE REGENERATIVE

I- Régénération et neurogenèse régénérative

1. La régénération : définition et concepts historiques

La régénération est définie comme le remplacement ou la reconstruction morphologique et fonctionnelle de tissus ou organes qui ont été perdus ou détruits. Ce processus implique un renouvellement coordonné de différents types cellulaires à partir de cellules préexistantes.

La régénération physiologique est un processus naturel de renouvellement cellulaire présent chez la plupart des animaux qui ont développé des stratégies pour maintenir leurs fonctions vitales et leur forme tout au long de leur vie. Chez les vertébrés, de nombreux types cellulaires ont une durée de vie courte et doivent être continuellement remplacés comme les cellules sanguines, la peau ou l'épithélium de l'intestin. De plus, de nombreux organismes perdent naturellement une partie de leur corps et la remplacent, dans la plupart des cas plusieurs fois au cours de leur vie. Le changement d'exosquelette des crustacés ou de peau des serpents et le renouvellement annuel des bois des cervidés en sont quelques exemples.

La régénération réparatrice est le terme utilisé pour tous les cas de régénération post-traumatiques. Bely et Nyberg ont proposé une classification des processus régénératifs en cinq types selon les niveaux d'organisation biologique concernés (**figure 15**) (Bely and Nyberg, 2010).

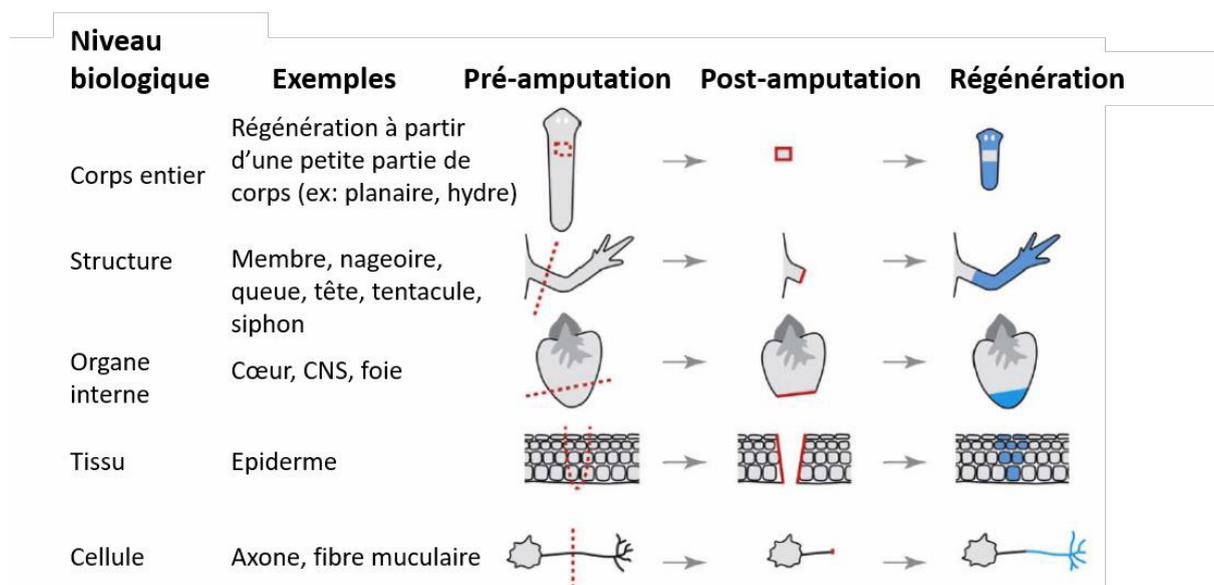


Figure 15 : Régénération à différents niveaux d'organisation biologique. Les lignes rouges en pointillé

indiquent les plans d'amputation, les lignes rouges pleines montrent les surfaces de cicatrisation et les parties régénérées sont dessinées en bleu. Adapté de Bely and Nyberg, 2010.

La guérison de blessures au niveau de l'épiderme est un processus de réparation efficace chez la plupart des organismes, mais les capacités de régénération d'autres organes ou structures varient énormément entre espèces. Quand une planaire ou une hydre sont coupées en morceaux, elles peuvent régénérer toutes les parties de leur corps. Certains vertébrés comme les amphibiens et les poissons téléostéens peuvent régénérer les membres ou les nageoires (Brookes and Kumar, 2002; Poss et al., 2003), la queue (Gargioli and Slack, 2004), le cristallin, la rétine (Barbosa-Sabanero et al., 2012), différents organes internes comme le cœur ou le pancréas (Poss et al., 2002; Poss, 2010), ainsi que les muscles squelettiques, le système nerveux périphérique (Rosenberg et al., 2012; Villegas et al., 2012) et le système nerveux central. Les mammifères ont, quant à eux, la possibilité de réparer les muscles squelettiques et le système nerveux périphérique (Huebner and Strittmatter, 2009) et de récupérer de dommages au foie (Michalopoulos, 2007) mais ils ont en revanche des capacités de régénération très limitées en ce qui concerne le cœur ou le SNC.

Avant de décrire en détail les mécanismes de neurogenèse régénérative chez les vertébrés, il m'a semblé intéressant de présenter brièvement les mécanismes de régénération d'appendices ou de corps entiers historiquement décrits que sont l'épimorphose, la morphallaxie ou bien la combinaison des deux.

L'épimorphose est un mécanisme de régénération qui implique la formation d'un blastème. Le blastème est formé de deux feuilletts cellulaires : une couche de cellules externes épithéliales qui recouvre la plaie et une autre de cellules internes d'origine mésodermiques (cellules mésenchymateuses) en contact avec les tissus du moignon. L'interaction des cellules épithéliales et mésenchymateuses est cruciale pour la suite du processus, elle permet l'induction de la différenciation des tissus manquants. Les cellules du blastème, appelées néoblastes, sont multipotentes. Elles prolifèrent et se différencient en cellules nécessaires à la restauration du membre amputé. Ce mécanisme de régénération est commun aux planaires, aux gastéropodes, aux échinodermes, aux urochordés, et à la régénération de la patte, de la queue ou de la nageoire chez les vertébrés (Sánchez Alvarado, 2000).

Le mécanisme de morphallaxie fait essentiellement intervenir un remaniement des cellules présentes pour créer *de novo* les tissus manquants. Il ne nécessite pas ou peu de prolifération cellulaire. Il a pendant longtemps été décrit comme le mécanisme de régénération chez l'hydre (Cummings and Bode, 1984).

L'épimorphose et la morphallaxie ont été originellement définis par Morgan en 1901, sans observation au niveau cellulaire et généralement présentés comme deux phénomènes opposés. Mais des études plus récentes tendent à gommer les frontières des deux processus. Un exemple notable est celui de l'hydre qui semble utiliser ces deux mécanismes de régénération selon le site de coupure. En effet, lorsqu'elle est décapitée, la régénération se fait sans contribution significative de cellules en prolifération et donc via morphallaxie. En revanche, lorsqu'un animal est coupé en deux transversalement, la régénération du pied fait intervenir une zone de prolifération sous-jacente à une zone d'apoptose massive à l'extrémité de la coupure, se faisant donc par épimorphose (Chera et al., 2009).

2. La neurogenèse régénérative, un domaine de recherche à potentiel thérapeutique

Les lésions cérébrales causées par un traumatisme ou un accident vasculaire cérébral (AVC) ainsi que les lésions médullaires (qui concernent la moelle épinière), sont des troubles complexes du SNC associés à une perte massive de neurones. Le SNC est un des tissus les plus importants par son implication dans différents processus vitaux comme le contrôle des mouvements, des comportements complexes et la régulation du système endocrinien. La survie de l'animal peut être compromise par une lésion cérébrale. Il a été estimé que globalement chaque année, dans le monde entier, 10 millions de personnes souffrent d'une lésion cérébrale par traumatisme (Hyder et al., 2007), environ 17 millions d'un AVC (Feigin et al., 2014) et jusqu'à 500 000 personnes d'une lésion médullaire (Bickenbach et al., 2013). Certains traitements pharmacologiques et thérapies de réhabilitation peuvent conduire à de modestes améliorations chez certains individus, mais aucun traitement n'existe encore pour guérir de ce type de lésions (Fehlings and Baptiste, 2005; Behrman et al., 2006; El-Kheir et al., 2014).

La neurogenèse régénérative est le processus qui permet la production de nouveaux neurones dans le SNC dans le but de restaurer des fonctions spécifiques. Cela nécessite que (1) des progéniteurs compétents à se différencier en types cellulaires perdus soient présents dans le tissu. Ces progéniteurs sont présents avant la réponse régénérative, ce sont des progéniteurs constitutifs, ou bien ils sont générés par dédifférenciation de cellules différenciées déjà existantes, ce sont des progéniteurs latents. (2) La prolifération des progéniteurs soit suffisante pour servir de réservoir de cellules nouvellement créées. (3) La régénération soit finement régulée pour que les nouvelles cellules générées se différencient en types cellulaires perdus et restaurent la fonction de la précédente structure.

Dans une perspective thérapeutique, l'activation de progéniteurs constitutifs ou latents semble être une stratégie prometteuse. En effet, je décrirai plus en détail dans la suite de ce chapitre qu'une augmentation de la prolifération de ces deux types de progéniteurs a été observée après différentes expériences de lésion cérébrale chez les rongeurs. Une fois générés, ces nouveaux progéniteurs doivent avoir la capacité de dévier du modèle normal de neurogenèse pour migrer vers les sites de lésion. Un tel changement de migration est communément observé à la suite d'une lésion, lorsque les neuroblastes générés au niveau de la SVZ changent leur trajet vers la zone voisine de la blessure (Arvidsson et al., 2002; Parent et al., 2002; Jin et al., 2003; Yamashita et al., 2006). Cette région est caractérisée par une angiogenèse prononcée chez les rongeurs (Ohab et al., 2006; Thored et al., 2007). La neurogenèse et l'angiogenèse dans cette région sont liées car les cellules de la SVZ expriment des gènes impliqués dans l'angiogenèse après une lésion (Liu et al., 2007a) et que les cellules endothéliales produisent des facteurs qui induisent la neurogenèse, la différenciation neuronale et la survie de nouveaux neurones (Leventhal et al., 1999; Jin et al., 2002).

Malgré ces découvertes, une thérapie de remplacement cellulaire basée sur l'activation de progéniteurs endogènes est encore loin d'être à l'ordre du jour pour des essais cliniques. De nombreux obstacles doivent encore être levés comme l'activation d'un nombre suffisant de progéniteurs, la migration ciblée des neuroblastes vers les régions lésées, leur différenciation en neurones fonctionnels et la survie à long terme de ces nouveaux neurones. De plus, la neurogenèse régénérative nécessite un contrôle précis d'un certain nombre de paramètres tels que la régulation de l'inflammation ou encore celle de la prolifération cellulaire afin de diminuer le risque de tumeurs.

La mise en œuvre d'approches thérapeutiques chez l'humain reposera sur la compréhension détaillée des mécanismes de réparation du système nerveux central chez différents modèles de vertébrés comme les rongeurs et des vertébrés non mammaliens comme les amphibiens et les poissons téléostéens qui ont des capacités de régénération neuronale beaucoup plus importantes que les mammifères.

Dans la suite de ce chapitre, je détaillerai la production de nouveaux neurones à la suite de lésions, soit à partir de progéniteurs constitutifs ou bien de progéniteurs latents chez des modèles mammifères (rat et souris) et téléostéens (essentiellement le poisson zèbre).

II-Régénération neuronale à partir de progéniteurs constitutifs

1. A partir de progéniteurs gliaux chez les mammifères

Plusieurs exemples chez les mammifères montrent le recrutement de progéniteurs constitutifs pour restaurer avec succès des fonctions neuronales. L'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne induit une ischémie dans l'aire ipsilatérale du cortex cérébral et du striatum (ischémie focale) (Ginsberg and Busto, 1989). Ce modèle de lésion, le plus couramment utilisé, induit une prolifération cellulaire de cellules souches au niveau de la SVZ chez le rat (Jin et al., 2001; Zhang et al., 2001; Li et al., 2002; Parent et al., 2002), la souris (Ohab et al., 2006; Zhang et al., 2014) et le macaque (Tonchev et al., 2005). Ces cellules se différencient en neuroblastes qui migrent à travers le striatum vers le cortex où ils se différencient à leur tour en neurones (Zhang et al., 2001; Parent et al., 2002; Yamashita et al., 2006) (**figure 16**). En effet, de nombreuses cellules, co-marquées au BrdU (utilisé pour visualiser des cellules en prolifération à un temps t) et avec un marqueur neuronal (NeuN), ont été localisées au niveau du striatum après une ischémie (Arvidsson et al., 2002). De plus, il a été montré que les nouveaux neurones migrent directement de la SVZ au striatum dans le cerveau post-ischémique chez le rat via le RMS (Jin et al., 2003).

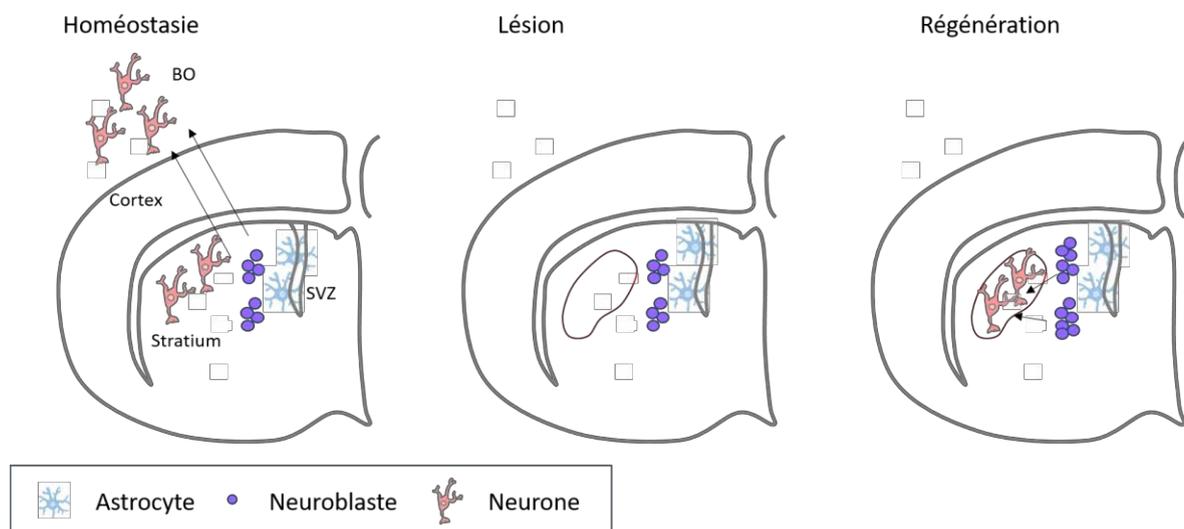


Figure 16 : Régénération neuronale à partir d'astrocytes depuis la SVZ chez les rongeurs. Schéma d'une coupe coronale de télencéphale. La zone lésée est indiquée en rouge. Les flèches indiquent la migration. Adapté de Alunni and Bally-Cuif, 2016.

BO : bulbes olfactifs ; SVZ : subventricular zone

D'autres manières d'induire une ischémie mènent également à la prolifération d'astrocytes dans la SVZ. Lors de la destruction spécifique de motoneurones cortico-spinaux chez la souris induite par la lumière, des neuroblastes sont observés entrant dans le cortex et se différenciant

progressivement en neurones pyramidaux matures dans la couche corticale V (Chen et al., 2004).

Plusieurs études montrent également que les ischémies peuvent induire une augmentation de la prolifération cellulaire de cellules souches au niveau de la SGZ chez les rongeurs (Yagita et al., 2001; Nakatomi et al., 2002; Sharp et al., 2002). L'augmentation de la prolifération commence 3-4 jours post-ischémie, atteint son niveau maximum entre 7 et 10 jours, avant de revenir à un niveau contrôle entre 3 et 5 semaines (Takasawa et al., 2002; Dempsey et al., 2003; Zhu et al., 2003). Une semaine après un accident ischémique chez le rat, une augmentation de la production cellulaire de 2 à 3 fois est observée dans le gyrus denté par rapport au niveau basal des animaux contrôles. Cinq semaines post-ischémie, plus de 60% de ces cellules expriment la Calbindine, une protéine de liaison au calcium normalement exprimée chez les neurones granulaires matures (Kee et al., 2001). La destruction de neurones pyramidaux au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe de rat stimule l'activation des astrocytes de la SGZ et leur migration vers la couche CA1 pour générer de nouveaux neurones (Nakatomi et al., 2002) (**figure 17**).

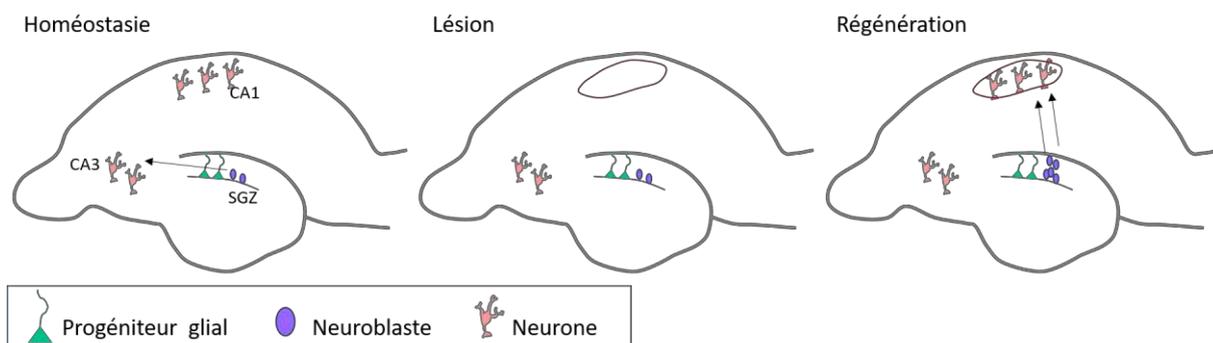


Figure 17 : Régénération neuronale à partir de progéniteurs gliaux de la SGZ chez les rongeurs. Schéma d'une coupe sagittale de l'hippocampe. La zone lésée est indiquée en rouge. Les flèches indiquent la migration. Adapté de Alunni and Bally-Cuif, 2016.

2. A partir de progéniteurs gliaux chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre adulte a la capacité de régénérer des neurones du cerveau antérieur dorsal (pallium) de manière efficace, après lésions mécaniques (Ayari et al., 2010; Kroehne et al., 2011; März et al., 2011; Baumgart et al., 2012; Kishimoto et al., 2012) ou injection de substances neurotoxiques (Skaggs et al., 2014). Les lésions mécaniques ont été réalisées de deux manières différentes, lésion uniquement du parenchyme qui préserve l'intégralité du ventricule par insertion d'une aiguille ou d'un capillaire en verre à travers les narines (Ayari et

al., 2010; Kroehne et al., 2011; Baumgart et al., 2012), ou bien insertion verticale d'une aiguille dans la partie dorso-latérale d'un hémisphère télencéphalique directement à travers la boîte crânienne ce qui a pour conséquence d'endommager la zone ventriculaire (Kishimoto et al., 2012) et le parenchyme (März et al., 2011). Dans le cas de la lésion par neurotoxicité, de l'acide quinolinique (QA, quinolic acid) a été injecté dans le télencéphale. Cette excitotoxine est un métabolite de la voie de la voie kynurénine qui agit comme antagoniste des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), activés sous conditions physiologiques par la glycine et le glutamate. La sensibilité de l'acide quinolinique varie selon les régions de cerveau. Chez les mammifères, les neurones du néocortex, du striatum et de l'hippocampe sont particulièrement sensibles à cette molécule (Guillemin, 2012). L'acide quinolinique est utilisé pour mimer des pathologies, comme la maladie de Huntington par perte sélective des neurones du striatum (Beal et al., 1986; Ferrante et al., 1993), ou des ischémies cérébrales (Darlington et al., 2007; Stone et al., 2012). Chez le poisson zèbre, Skaggs et al. ont montré que cette toxine peut être utilisée pour mimer des phénomènes de neurodégénération ou des dommages cérébraux (Skaggs et al., 2014).

Dans un premier temps, toutes les lésions dans le télencéphale chez le poisson zèbre conduisent à une activation du système immunitaire, le nombre de leucocytes et de cellules microgliales augmentant de manière significative pendant plusieurs jours dans l'hémisphère pallial lésé (Baumgart et al., 2012; Kyritsis et al., 2012; Skaggs et al., 2014). Dans un second temps, des cellules ventriculaires sont recrutées pour proliférer. Des expériences de lignage cellulaire ont permis de montrer que ce sont les cellules de glie radiaires ventriculaires (*her4.1* positives) qui prolifèrent et génèrent des neuroblastes. Ces neuroblastes migrent à travers la zone périventriculaire et le parenchyme vers le site de lésion où ils vont se différencier en neurones matures (Kroehne et al., 2011) (**figure 18**). Récemment, des expériences de lignage cellulaire par imagerie *in vivo* ont montré un changement dans les modes de division des progéniteurs, les divisions symétriques neurogéniques, plus propices à la réparation neuronale, étant recensées en nombre plus important au niveau du télencéphale lésé (Barbosa et al., 2015).

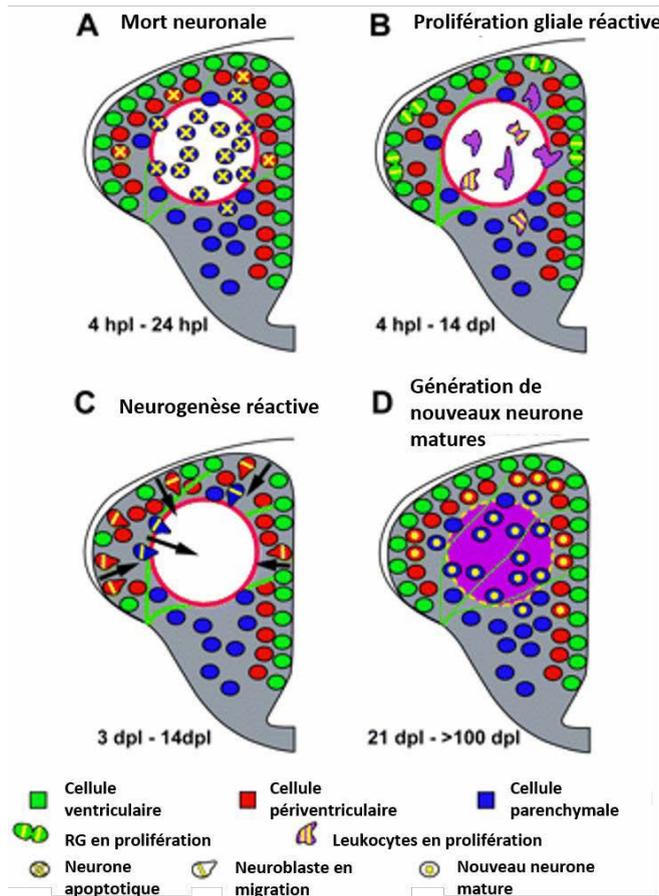


Figure 18 : Evènements clés de la régénération du télencéphale chez le poisson zèbre adulte après lésion.

A – De 4 à 24 hpl, des neurones du parenchyme et de la zone périventriculaire meurent.

B – De 4 hpl à 14 dpl, les cellules microgliales résidentes prolifèrent activement avec un pic à 3 dpl.

C – De 3 à 14 dpl, les glies radiales prolifèrent et par la suite entrent en neurogenèse.

D – De 21 à 100 dpl, de nombreux nouveaux neurones matures sont détectés au niveau du parenchyme et de la zone périventriculaire du site de lésion.

Adapté de (Kroehne et al., 2011).

Le site de lésion est indiqué par un cercle rouge.

hpl: hour post-lesion, dpl day post-lesion

3. A partir de progéniteurs neuroépithéliaux

Chez de nombreuses espèces non mammaliennes et notamment les poissons téléostéens, des cellules souches de type neuroépithélial participent à la neurogenèse constitutive de différentes régions de CNS chez l'adulte (voir section I-2.2.b du chapitre 1 d'introduction).

Récemment, il a été démontré que ces cellules participent à la régénération du cervelet chez le poisson zèbre (Kaslin et al., 2017). En condition homéostatique, les cellules souches neuroépithéliales des lèvres rhombiques génèrent des cellules granulaires tout au long de la vie de l'animal (Kaslin et al., 2009, 2013). Les progéniteurs gliaux de la zone ventriculaire du cervelet génèrent les autres types cellulaires à savoir les cellules de Purkinje, les cellules eurydendroïdes et les cellules stellaires. L'activité de ces progéniteurs cesse chez l'adulte (Kaslin et al., 2009, 2013). Une trépanation chirurgicale a été réalisée au niveau du cervelet afin de détruire tous les différents types cellulaires qui composent cette structure tout en préservant la zone de cellule souche. Des expériences de lignages cellulaires ont montré que seuls les NECs sont activées chez l'adulte et qu'ils ne sont capables de régénérer qu'un seul type de neurones, les cellules granulaires (**figure 19**).

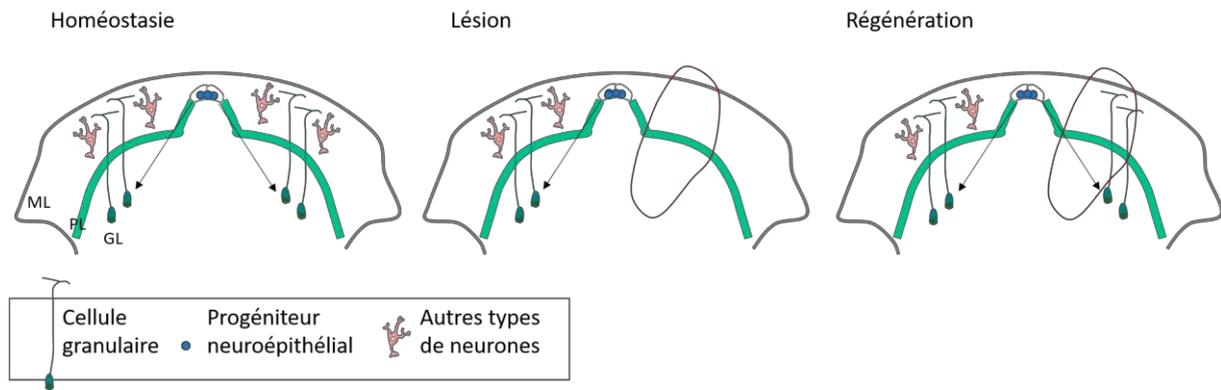


Figure 19 : Régénération des cellules granulaires à partir de progéniteurs neuroépithéliaux au niveau du cervelet de poisson zèbre. Schéma d'une coupe transversale de cervelet. La zone lésée est indiquée en rouge. Les flèches indiquent la migration.

ML : molecular layer ; PL : Purkinje layer ; GL : granular layer

Chez le poisson zèbre, les NECS qui composent la CMZ de la rétine ne sont pas recrutées à la suite d'une lésion (voir section III-1 du chapitre 2 d'introduction), toutefois il est intéressant de noter que ces cellules sont à l'origine de la régénération totale de la rétine chez *Xenopus tropicalis* (Miyake and Araki, 2014) (**figure 20**).

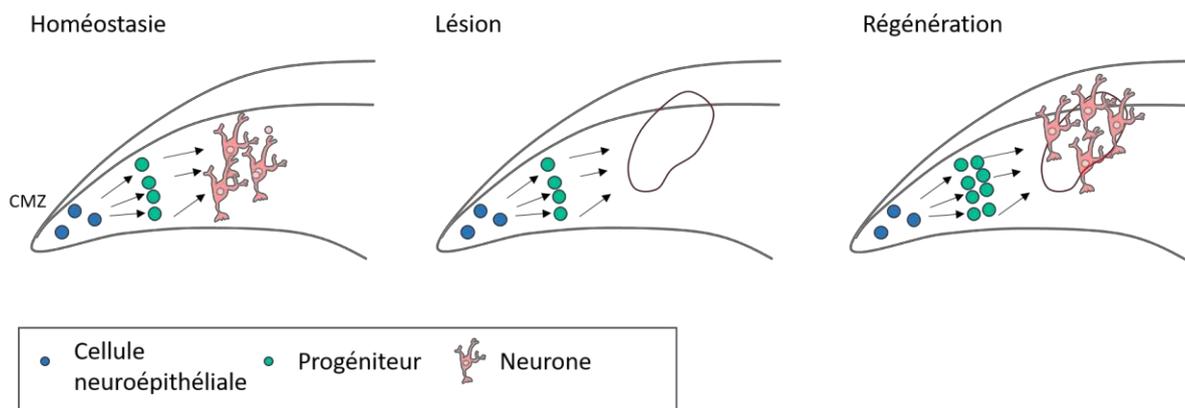


Figure 20 : Régénération neuronale à partir de progéniteurs neuroépithéliaux au niveau de la rétine de *Xenopus tropicalis*. La zone lésée est indiquée en rouge. Les flèches indiquent la migration. Adapté de Alunni and Bally-Cuif, 2016.

CMZ : ciliary marginal zone

Par ailleurs, un autre mécanisme de régénération intervient dans la rétine lésée chez *Xenopus laevis*, ce sont les cellules rétinienne pigmentées qui sont à l'origine de la régénération rétinienne par un processus de transdifférentiation (Arresta et al., 2005).

III- Régénération neuronale à partir de progéniteurs latents

Certaines réponses régénératrices chez les vertébrés non mammaliens n'impliquent pas de niches neurogéniques constitutivement actives mais recrutent plutôt des progéniteurs latents.

L'exemple le plus étudié est celui de la rétine où une population de cellules gliales, les glias de Müller, deviennent une source de nouveaux neurones à la suite d'une lésion alors qu'en conditions homéostatiques elles ne possèdent pas un grand potentiel neurogénique (Raymond et al., 2006; Bernardos et al., 2007; Fimbel et al., 2007). Les cellules épendymaires du canal central de la moelle épinière agissent également comme des progéniteurs à la suite d'une lésion de cette structure chez le poisson zèbre (Reimer et al., 2008). De manière intéressante, des études chez les rongeurs montrent la plasticité des cellules non neurogéniques, comme les cellules épendymaires et les astrocytes du parenchyme, en réponse à une lésion cérébrale ou médullaire (Buffo et al., 2008; Carlén et al., 2009; Barnabé-Heider et al., 2010; Sirko et al., 2013; Magnusson et al., 2014).

1. Réactivation de progéniteurs latents dans la rétine

La rétine de vertébré est divisée en trois couches : la couche nucléaire externe (ONL, outer nuclear layer), la couche nucléaire interne (INL, inner nuclear layer) et la couche de cellules ganglionnaires (GCL, ganglion cell layer) (**figure 21**). Au niveau de l'ONL résident les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) qui perçoivent la lumière et transmettent l'information aux cellules ganglionnaires via les interneurones qui se trouvent dans l'INL. Les cellules ganglionnaires transfèrent l'information visuelle vers le cerveau grâce à leurs axones via le nerf optique. La rétine comporte une couche pigmentaire externe contiguë à la choroïde et dont les cellules absorbent la lumière et l'empêchent de diffuser dans l'œil.

La rétine croît tout le long de la vie des poissons téléostéens par addition de nouveaux neurones générés par différenciation des cellules produites au niveau de la CMZ (voir section I-2.2.b du chapitre 1 d'introduction). Au cours du développement, les nouveaux neurones sont générés séquentiellement, les cellules ganglionnaires en premier, puis les interneurones (cellules amacrines, cellules bipolaires, cellules horizontales), puis les photorécepteurs de type cône. Les cellules de glie de Müller, distribuées tout le long de la rétine différenciée, génèrent les bâtonnets, elles se divisent rarement chez l'adulte.

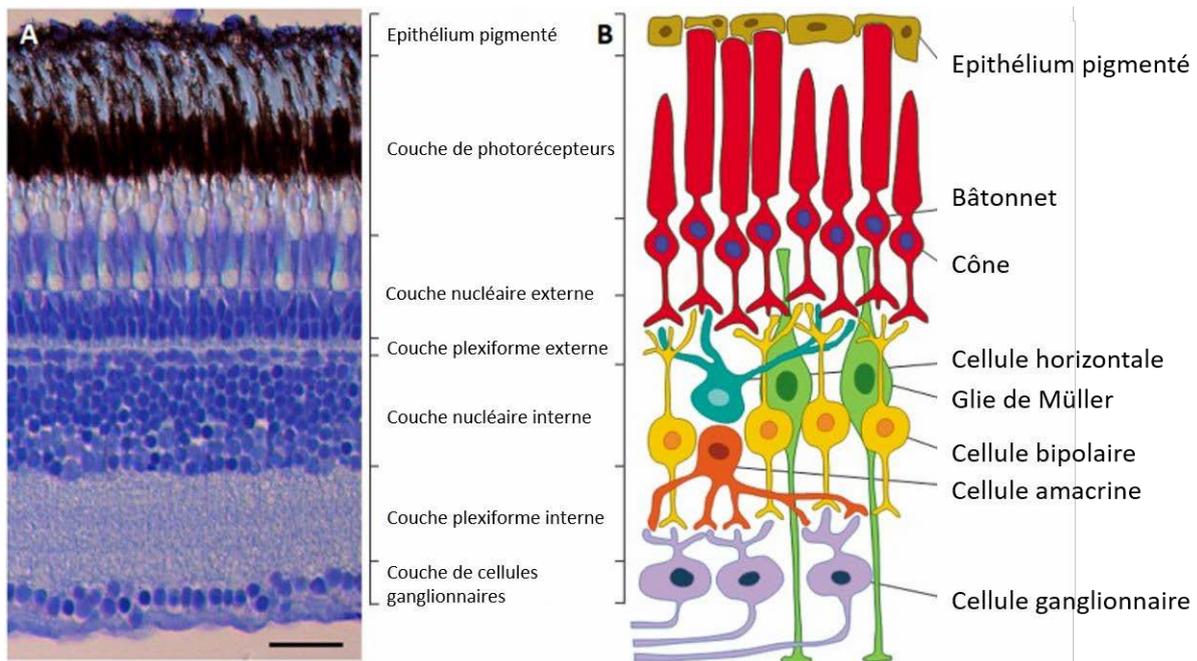


Figure 21 : Structure de la rétine du poisson zèbre adulte. Adapté de Gramage et al., 2014.

- **A** : Microphotographie d'une coupe transversale de rétine montrant les différentes couches cellulaires. Barre d'échelle = 25µm
- **B** : Schéma de la rétine montrant les six types de neurones et les deux types cellulaires de support (glies de Müller et cellules pigmentées).

1.1 Méthodes de lésions

A la fin des années 1970, Lombardo montre pour la première fois que les neurones rétiniens ont la capacité de régénérer. En effet, après ablation chirurgicale du cadran dorsal de la rétine chez le poisson rouge adulte, des figures mitotiques ont été observées dans la CMZ et le long des bordures de la blessure (Lenkowski and Raymond, 2014). Depuis, la régénération rétinienne a été étudiée chez différentes espèces de poissons téléostéens : le perche-soleil verte (*Leopomis cyanellus*) (Cameron and Easter, 1995), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Faillace et al., 2002), la plie rouge (*Pleuronectes americanus*) (Mader and Cameron, 2004) et le poisson zèbre (Cameron, 2000; Cameron and Carney, 2000; Yurco and Cameron, 2005; Bernardos and Raymond, 2006; Fausett and Goldman, 2006; Fimbel et al., 2007).

De nombreuses techniques ont été développées pour détruire les neurones rétiniens : excisions chirurgicales de petites parties de rétines, injection intraoculaire de neurotoxines, exposition à la lumière.

Chez le poisson rouge, l'injection intraoculaire à haute dose de la neurotoxine ouabaïne (inhibiteur de la pompe à sodium Na-K ATPase) induit la destruction complète de la rétine alors qu'à faible dose elle provoque une destruction des neurones rétiniens des couches internes mais pas de ceux des couches externes (Maier and Wolburg, 1979). L'ouabaïne diffuse dans la rétine

à partir du corps vitré, les neurones rétiniens internes sont ainsi exposés à une plus forte concentration de toxine c'est pourquoi ils sont préférentiellement détruits (Raymond et al., 1988). D'autres neurotoxines ont été utilisées pour détruire spécifiquement certaines cellules de la rétine. Par exemple, la tunicamycine cible les bâtonnets (Negishi et al., 1991a) et la 6-hydroxydopamine les neurones interplexiformes dopaminergiques (Negishi et al., 1991b; Braisted and Raymond, 1992).

Des méthodes qui détruisent spécifiquement les photorécepteurs par la lumière ont également été développées. La première consiste à exposer des poissons zèbres à une lumière constante et modérée (3000 à 20000 lux) pendant plusieurs jours après qu'ils aient été conditionnés à l'obscurité (Vihtelic and Hyde, 2000). Cela permet d'endommager principalement les bâtonnets qui sont plus sensibles que les cônes. La seconde méthode consiste à exposer des poissons zèbres à une très forte lumière (>100 000 lux) pendant une courte période (Bernardos et al., 2007). Dans ce cas, les cônes et les bâtonnets sont détruits (Qin et al., 2009). Dans ces deux situations, les photorécepteurs régénèrent. La combinaison des deux méthodes permet d'obtenir une destruction plus importante de photorécepteurs (Thomas et al., 2012).

La régénération des photorécepteurs a été également étudiée à l'aide de modèles d'études mimant une dégénérescence de ces cellules chez le poisson zèbre. L'utilisation du promoteur « rod opsin » de xénope chez le poisson zèbre produit une dégénérescence des bâtonnets certainement due à la toxicité de la protéine rapportrice utilisée (Morris et al., 2005). Il existe aussi des modèles d'ablation génétique conditionnelle. Dans ces lignées transgéniques, les photorécepteurs expriment l'enzyme nitroréductase d'*E. coli* (Montgomery et al., 2010; Fraser et al., 2013). Cette enzyme a la propriété de réduire le radical nitrite de certains substrats comme le métronidazole en dérivé hydroxylamine extrêmement toxique pour la cellule qui l'exprime.

1.2 Les glies de Müller à l'origine de la régénération rétinienne

Les premières études de régénération ont montré une augmentation de l'activité mitotique au niveau de la couche nucléaire externe et de la CMZ (Maier and Wolburg, 1979; Kurz-Isler and Wolburg, 1982; Negishi et al., 1987; Raymond et al., 1988) suggérant que les cellules de la CMZ contribuent à la régénération rétinienne. Cependant, quand les photorécepteurs de la couche nucléaire externe sont détruits, des cellules en prolifération avec une morphologie allongée apparaissent dans la couche nucléaire interne (Vihtelic and Hyde, 2000), les glies de Müller réentrent dans le cycle cellulaire ce qui est visible notamment par une re-migration de leur noyau

au pôle apical (Braisted et al., 1994). De plus, l'inhibition de la prolifération des glies de Müller au cours de la régénération bloque le processus de régénération (Thummel et al., 2008).

Le rôle des glies de Müller comme progéniteurs neuronaux dans la rétine lésée de poisson zèbre a été démontré définitivement par des expériences de lignage cellulaire réalisées par trois groupes de chercheurs différents (Fausett and Goldman, 2006; Bernardos et al., 2007; Fimbel et al., 2007).

Le gène *tuba1a* code pour une isoforme de l' α -tubuline spécifique des neurones. La lignée transgénique du promoteur du gène *tuba1a* permet l'expression de la protéine fluorescente GFP dans les glies de Müller à la suite d'une lésion dans la rétine. Dans ce cas, la GFP co-localise avec des marqueurs des glies de Müller (GFAP, GS). De plus, ces cellules incorporent de la BrdU et expriment le marqueur des progéniteurs rétiniens Pax6. Sept jours après la lésion (dpl, days post-lesion), les cellules positives à la GFP sont co-marquées avec HuC/D, un marqueur des cellules ganglionnaires et amacrines de la rétine (Fausett and Goldman, 2006). Des expériences utilisant le système de lignage conditionnel cre/lox ont été réalisées. Après lésion, la recombinaison montre l'expression de *tuba1a* dans les glies de Müller qui ré-entrent dans le cycle cellulaire et ces cellules génèrent tous les types de neurones lésés (Ramachandran et al., 2010a).

Le second groupe a utilisé une lignée transgénique où la GFP est exprimée dans les noyaux des glies de Müller et ont tiré avantage de la persistance de l'expression de cette protéine pour la suivre tout au long du processus de régénération. A la suite d'une destruction de photorécepteurs par la lumière, les glies de Müller GFP⁺ ré-entrent dans le cycle cellulaire à 1 et 2 dpl, puis la GFP apparaît dans des progéniteurs multipotents (Pax6⁺) présents dans des clusters neurogéniques de l'INL à 3 et 4 dpl. A 4 et 5 dpl l'expression de la GFP est retrouvée dans des progéniteurs de photorécepteurs (Crx⁺, marqueur de photorécepteur cone-rod homeobox) et finalement dans des photorécepteurs immatures à 5 et 6 dpl. Ces derniers ont été identifiés selon leur morphologie et par immunologie avec un anticorps spécifique des cônes, *zpr1* (Bernardos et al., 2007).

Le troisième groupe a utilisé l'injection intraoculaire d'ouabaine pour détruire des neurones rétiniens et suivre la réponse régénérative avec trois lignées transgéniques permettant l'expression de la GFP dans les glies de Müller (*gfap:EGFP*), des progéniteurs rétiniens (*olig2:EGFP*) et cellules ganglionnaires rétiniennes différenciées (*atoh7:EGFP*). L'expression

séquentielle de ces trois transgènes est cohérente avec la proposition que les glies de Müller sont la source de progéniteurs des neurones rétiniens (Fimbel et al., 2007).

Tous ces travaux ont permis de définir les différents événements cellulaires qui se déclenchent à la suite d'une lésion au niveau de la rétine. Après la mort de neurones rétiniens, les glies de Müller prolifèrent de manière asymétrique pour s'auto-renouveler et générer des progéniteurs. Ces progéniteurs prolifèrent rapidement et forment des clusters qui migrent vers la couche de la rétine endommagée où ils se différencient en types cellulaires manquants (**figure 22**).

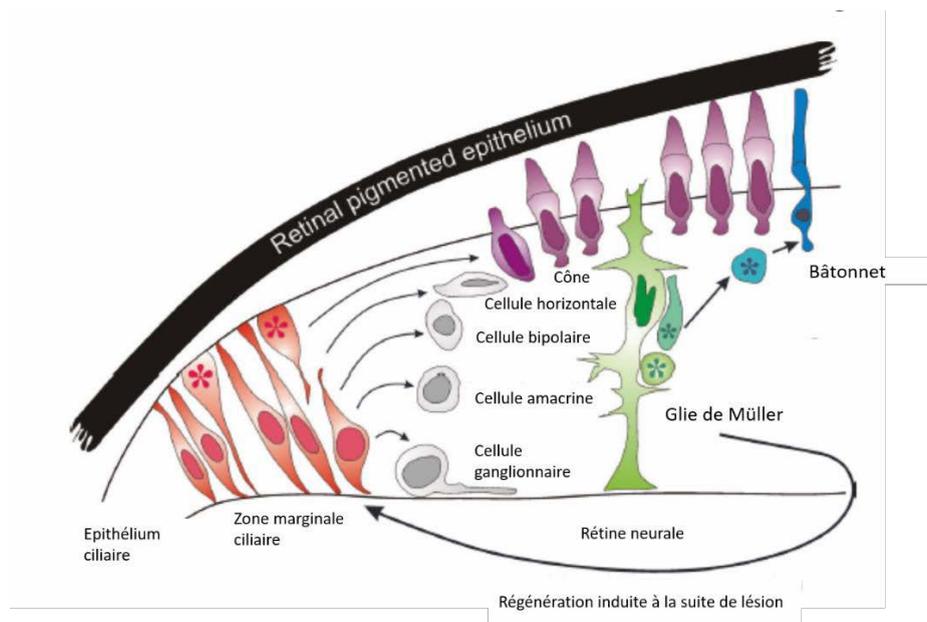


Figure 22 : Neurogenèse de la rétine de poisson zèbre adulte au cours de la croissance et de régénération.

La CMZ entre l'épithélium ciliaire et la rétine neurale contient des cellules souches neuroépithéliales (en rouge). Ces cellules sont en prolifération (indiquées par un astérisque). Elles sont à l'origine de tous les types de neurones rétiniens à l'exception des bâtonnets, qui sont eux générés par les glies de Müller présentes dans la rétine différenciée. A la suite d'une lésion, les glies de Müller se différencient, créant ainsi une population de cellules progénitrices qui forment une niche neurogénique. Ces progéniteurs vont générer tous les types cellulaires perdus par la lésion. Adapté de Raymond et al., 2006 et Zupanc and Sîrbulescu, 2011.

Ces nouveaux neurones sont-ils fonctionnels? Il a été récemment montré que des cellules bipolaires régénérées, suite à leur lésion spécifique chez des larves de poisson zèbre, réussissent une intégration fonctionnelle dans la rétine. Les connections dendritiques avec les cônes, bien que non identiques, ont été recrées de manière similaire (D'Orazi et al., 2016; Raymond, 2016).

1.3 Un complexe réseau de voie de signalisation est nécessaire à la régénération.

Différentes voies de signalisation entrent en jeu pour pouvoir induire la régénération de la rétine via la dédifférenciation des glies de Müller et sont résumées sur **la figure 23**.

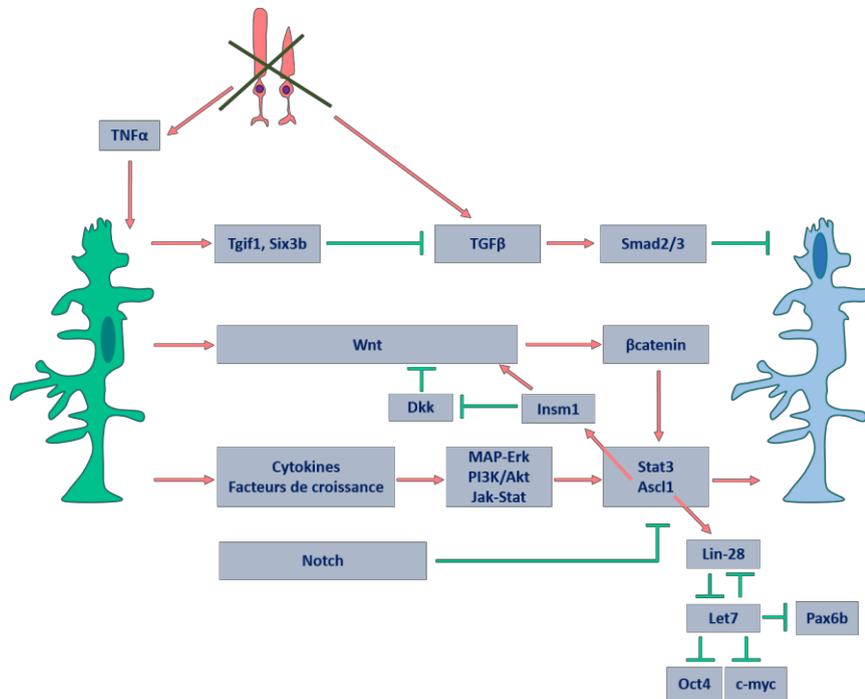


Figure 23 : Voies de signalisation régulant la dédifférenciation des glies de Müller et leur prolifération à la suite d'une lésion dans la rétine de poisson zèbre. Les neurones rétiens mourant sont représentés en rose, la glie de Müller activée est représentée en vert, la glie de Müller en dédifférenciation et en prolifération est représentée en bleu. Adapté de Hamon et al., 2016.

Des neurones apoptotiques dans la rétine endommagée sécrètent des facteurs comme la cytokine pro-inflammatoire TNF α (Tumor necrosis factor α), qui initie la prolifération des glies de Müller (Nelson et al., 2013). Une fois activées, les glies de Müller deviennent une source de facteurs de croissance et de cytokines, qui vont activer les gènes *stat3* (signal transducer and activator of transcription) et *ascl1* (achaete-scute family bHLH transcription factor 1) via les voies de signalisation MAPK-Erk (mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinase), PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B) et Jak-Stat (janus kinase) (Lenkowski and Raymond, 2014). La voie de signalisation Wnt/ β caténine est aussi activée dans les glies de Müller et induit l'expression d'*ascl1* (Meyers et al., 2012). *Ascl1* et *stat3* induisent la dédifférenciation et la prolifération de la glie de Müller (Nelson et al., 2012). La régulation du facteur de transcription bHLH *ascl1* est critique pour la régénération rétinienne. *Ascl1* agit en amont de *lin-28* qui contribue à la réponse des glies de Müller par un système de rétroaction, il réprime le micro-ARN *let7* ce qui suspend la répression de gènes comme *oct4* (octamer-binding transcription factor 4, *pou5f3* chez le poisson zèbre) et *c-myc* (*myca* chez le poisson zèbre) (Ramachandran et al., 2010b) qui sont des composants du

« cocktail de Yamanaka¹ ». L'activation d'Ascl1 permet également l'induction de l'expression de Pax6, qui est nécessaire à l'augmentation de prolifération cellulaire des progéniteurs (Thummel et al., 2008). De plus, Ascl1 induit l'expression du facteur de transcription Insm1, qui va activer la voie Wnt/ β caténine en stimulant l'expression du ligand Wnt4 et inhibant l'expression d'un répresseur de la voie Wnt, Dkk (Dickkopf) (Ramachandran et al., 2011). Un autre facteur bHLH, atoh7, est suffisant pour provoquer une réponse proliférative et neurogénique des glies de Müller quiescentes chez le médaka (Lust et al., 2016).

Notch inhibe l'expression d'ascl1/stat3 et ainsi préserve un pool de glies de Müller quiescentes dans la rétine lésée (Wan et al., 2012). La signalisation de TGF β (Transforming growth factor) via smad2/3 inhibe également la réponse proliférative des glies de Müller. Bien qu'il y ait une augmentation initiale de la signalisation TGF β dans les cellules de Müller, son inhibition par ses co-répresseurs tgif1 et six3b promeut la prolifération cellulaire (Lenkowski et al., 2013).

1.4 Vers un réveil des capacités régénératives chez les mammifères ?

Chez les mammifères, l'activation des glies de Müller en réponse à des lésions ne conduit pas à la régénération de neurones rétiniens mais à une gliose réactive. Dans un premier temps, la gliose réactive peut avoir des effets positifs de neuroprotection, les glies de Müller tentent alors de limiter les dommages tissulaires et la perte neuronale en libérant des facteurs neurotrophiques et des antioxydants. Mais une gliose prolongée entraîne des effets négatifs : division cellulaire non contrôlée et migration de glies de Müller, transdifférenciation des glies de Müller en myofibrocytes et formation de cicatrices gliales dans et à la surface de la rétine (Bringmann et al., 2006; Thomas et al., 2016).

A la suite d'une lésion, les glies de Müller de souris n'expriment pas Ascl1. Toutefois, la surexpression d'Ascl1 *in vitro* dans des cultures de glies de Müller de souris ou des explants rétiniens induit la ré-entrée des glies de Müller dans le cycle cellulaire et la prolifération de progéniteurs neuronaux (Pollak et al., 2013). A la suite d'une lésion, la surexpression d'Ascl1 *in vivo* dans des glies de Müller chez de jeunes souris permet la régénération de photorécepteurs, de cellules bipolaires et amacrines. Cependant, à 16 jours postnatals, les glies de Müller perdent leur capacité neurogénique malgré la surexpression d'Ascl1 (Ueki et al., 2015). Très

¹ L'équipe de Yamanaka a montré que l'expression ectopique de quatre facteurs de transcription Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc est suffisante pour la dédifférenciation de fibroblastes (Takahashi et al., 2007).

récemment, une étude a montré que la surexpression d'Ascl1 couplée à l'injection d'un inhibiteur de l'histone déacétylase permet à la souris adulte de régénérer des neurones à partir de glies de Müller à la suite d'une lésion de la rétine (Jorstad et al., 2017). L'inhibiteur d'histone déacétylase permet l'ouverture de la chromatine rendant ainsi des loci de gènes impliqués dans la différenciation neuronale accessibles, ce qui favorise l'efficacité de la reprogrammation. L'ensemble de ces résultats permet d'envisager des approches thérapeutiques.

Des études *in vitro* montrent qu'il est possible d'obtenir une quantité suffisante de progéniteurs rétiniens en vue de leur transplantation pour traiter des maladies dégénératives de la rétine. Une autre alternative thérapeutique serait de reprogrammer des glies de Müller endogènes, via notamment une induction transitoire d'Ascl1, rendue possible grâce à la boucle de rétroaction négative impliquant Insm1 (Ramachandran et al., 2012). La co-injection de TNF α et d'un inhibiteur de la voie Notch suffit à induire la régénération rétinienne avec des glies de Müller en prolifération et la génération de progéniteurs neuronaux (Conner et al., 2014) et pourrait être également envisagée comme thérapie. Mais il ne suffit pas de réussir à induire des processus régénératifs, il faut également pouvoir les limiter pour empêcher l'épuisement des progéniteurs, la sur-croissance de la rétine, le développement de tumeurs et/ou l'établissement d'une gliose réactive. Chez le poisson zèbre, la voie Notch joue ce rôle. L'expression d'insm1 dépendante de Notch contribue à arrêter la réaction de prolifération (Ramachandran et al., 2012), via l'inhibition de *stat3* et *ascl1* (Conner et al., 2014). Toutefois, le rôle de Notch chez les mammifères semble tout autre car il induit l'activation des glies de Müller dans des explants de rétines de rongeurs (Del Debbio et al., 2010).

2. Réactivation de progéniteurs latents dans la moelle épinière

2.1 Description de la moelle épinière de vertébrés

La moelle épinière a pour fonction (1) de relayer les informations motrices vers les muscles via un circuit descendant, (2) de véhiculer les informations sensorielles vers le cerveau via un circuit ascendant et (3) de coordonner certains réflexes. En coupe transversale, on peut distinguer deux régions : la matière blanche, située en périphérie qui contient les axones des neurones sensoriels et des motoneurones et la matière grise, en forme de papillon au centre, qui est constitué des corps cellulaires des neurones. Cette dernière région entoure le canal épendymaire, qui constitue l'extension des ventricules cérébraux, et contient le liquide cébrospinal. La moelle épinière contient des neurones, des astrocytes, des cellules progénitrices d'oligodendrocytes et des cellules épendymaires (**figure 24**).

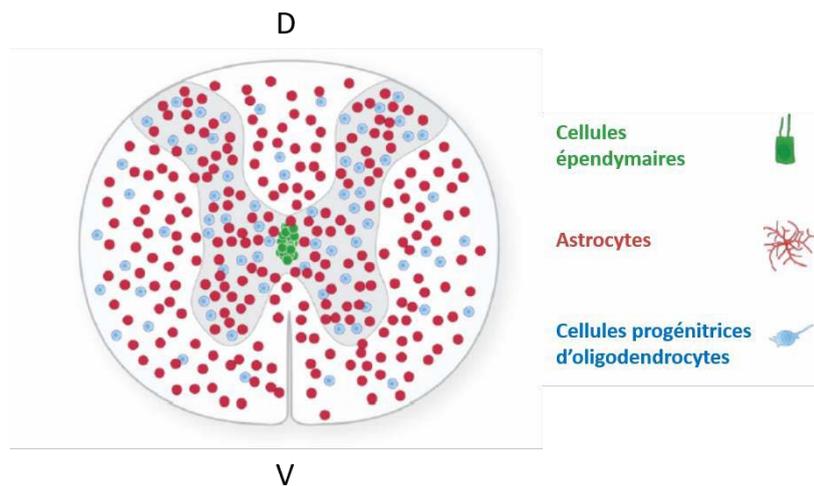


Figure 24 : Distribution des cellules gliales de la moelle épinière (coupe transversale).

D : Dorsal, V : Ventral.

Adapté de Sabelström et al., 2014.

Les astrocytes dans la moelle épinière de souris adulte présentent peu d'activité proliférative, celle-ci est restreinte à de l'auto-renouveau. Des expériences de lignage cellulaire n'ont pas mis en évidence que ces astrocytes pouvaient générer des cellules autres que des astrocytes (Barnabé-Heider et al., 2010).

Des progéniteurs d'oligodendrocytes sont dispersés dans la matière grise et la matière blanche et représentent la principale population cellulaire en prolifération dans la moelle épinière intacte mais n'ont pas de propriétés de cellules souches *in vitro* (Barnabé-Heider et al., 2010). Il semblerait que les précurseurs d'oligodendrocytes participent uniquement au lignage des oligodendrocytes que ce soit en situation d'homéostasie ou en situation de régénération (Barnabé-Heider et al., 2010; Kang et al., 2010). Les progéniteurs d'oligodendrocytes expriment des marqueurs comme PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor alpha) et NG2 (nerve/glial antigen-2) et sont également appelés cellules gliales NG2, cellules NG2 ou polydendrocytes (Nishiyama et al., 2009).

Des études de microscopie électronique ont montré que les cellules épendymaires de la moelle épinière présentent des morphologies hétérogènes. Les cellules épendymaires les plus abondantes sont des cellules cuboïdales multicillées (Meletis et al., 2008). D'autres n'ont qu'un cil, ce sont les tancytes. Les moins abondantes sont les cellules épendymaires radiaires, également appelées cellules épendymogliales, qui se situent dans les pôles dorsal et ventral du canal central. Elles étendent leur prolongement selon l'axe dorso-ventral (Meletis et al., 2008). Les cellules épendymaires de la moelle épinière prolifèrent peu (Meletis et al., 2008), celles qui prolifèrent le plus sont situées dans la partie dorsale du canal central (Hamilton et al., 2009).

Chez le poisson zèbre, les cellules épendymogliales expriment Blbp et/ou le facteur de transcription Olig2. Ces cellules se divisent lentement et de manière asymétrique pour s'auto-renouveler et produire des oligodendrocytes (Park et al., 2007).

2.2 Méthodes de lésions

La capacité de régénération de la moelle épinière à l'âge adulte dépend du groupe phylogénétique. La régénération spontanée de la moelle épinière à la suite d'une lésion a lieu rapidement et de manière efficace chez les poissons téléostéens et chez les amphibiens, elle est partielle chez les reptiles et n'a pas lieu chez les oiseaux et les mammifères (Sîrbulescu and Zupanc, 2011). Les premières observations d'une régénération fonctionnelle à la suite d'une lésion de la moelle épinière chez les poissons téléostéens ont été décrites chez le poisson rouge par Koppányi au début des années 1920 (Sîrbulescu and Zupanc, 2011). Par la suite, des études plus détaillées chez le poisson rouge (Hooker, 1930), la truite arc-en-ciel (Keil, 1940) et le médaka (Tuge and Hanzawa, 1937) confirment que la récupération du comportement de nage observée est accompagnée d'une régénération des fibres nerveuses qui font un pont de part et d'autre de la brèche induite par la transection de la moelle épinière (Sîrbulescu and Zupanc, 2011).

Chez les différentes espèces de poissons, deux types majeurs de lésions ont été utilisés (**figure 25**).

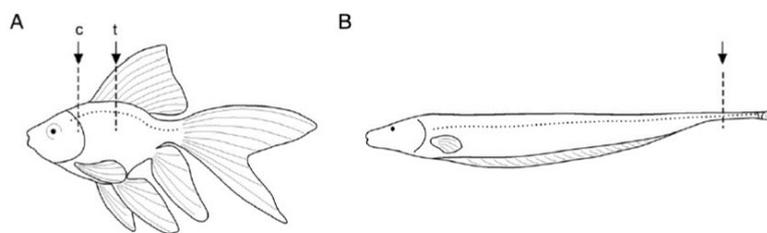


Figure 25 : Modèles de lésion (lignes pointillées) de moelle épinière chez les téléostéens.

A- Modèle de transection ou de contusion au niveau cervical (c) ou thoracique (t). **B-** Modèle d'amputation caudale (Sîrbulescu and Zupanc, 2011).

Le premier modèle consiste soit en une transection de la moelle épinière, soit à son écrasement. Ces expériences sont réalisées au niveau thoracique ou cervical ce qui a pour résultat de léser des axones. Cette méthode de lésion a été utilisée chez le poisson zèbre, le vairon (*Phoxinus phoxinus*), le guppy, l'anguille (*Anguilla anguilla*). Le second modèle est une amputation de la région caudale de la moelle épinière, ce qui enlève aussi des muscles, de la peau, de l'os et du cartilage. Cette méthode de lésion a été utilisée chez les poissons électriques *Apteronotus*

albifrons et *Apteronotus leptorhynchus* et également chez les amphibiens en vue d'étudier la régénération de la queue. Toutefois, cette deuxième méthode ne semble pas idéale pour étudier la régénération de la moelle épinière dans le but de pouvoir comparer les mécanismes de régénération entre mammifères et poissons.

Chez les mammifères, trois modèles de lésions de moelle épinière sont utilisés : la transection, l'hémisection dorsale qui détruit des extensions corticospinales et une partie de la substance grise et la contusion qui est une blessure par compression réalisée à l'aide d'un poids (Ghosh and Hui, 2016).

Les modèles de lésions de la moelle par écrasement sont plus proches de celles que peuvent subir les humains. En effet, les lésions sont très rarement des ruptures anatomiques avec perte de continuité mais plutôt des contusions.

2.3 Les cellules épendymaires à l'origine de la régénération de la moelle épinière

A la suite d'une lésion de la moelle épinière, le poisson zèbre a la capacité de régénérer des projections axonales (Becker et al., 1997). Il peut également produire des nouveaux neurones et des interneurons au niveau de la région endommagée (Reimer et al., 2008; Kuscha et al., 2012). Les cellules épendymogliales sont à l'origine de ces nouvelles cellules, elles ré-entrent dans le cycle cellulaire, migrent et se différencient en neurones. Leur position dorso-ventrale autour du canal central va définir quel type de neurones elles vont générer (**figure 26**).

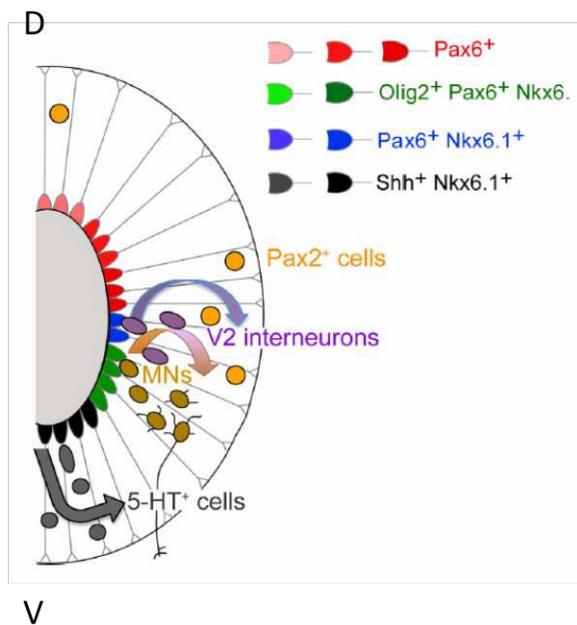


Figure 26 : Organisation des zones de progéniteurs et des nouveaux neurones générés à la suite d'une lésion de la moelle épinière chez le poisson zèbre adulte. Le canal central est représenté par un ovale sur ce schéma de coupe transversale de moelle épinière (Kuscha et al., 2012).

D : Dorsal, MNs : motoneurons, V : Ventral.

Les neurones sérotonergiques ont une origine ventrale (Kuscha et al., 2012). Les motoneurones ont pour origine une zone où les cellules épendymaires expriment Olig2, Pax6 et Nkx6.1 (Reimer et al., 2008, 2009). Les interneurones V2 ont pour origine une zone où les cellules épendymaires n'expriment pas Olig2 mais expriment Pax6 et Nkx6.1 (Kuscha et al., 2012).

La régénération axonale de part et d'autre du site de lésion est dépendante de la formation d'un pont glial qui va servir de véritable échafaudage pour la croissance des axones (**figure 27**) (Goldshmit et al., 2012).

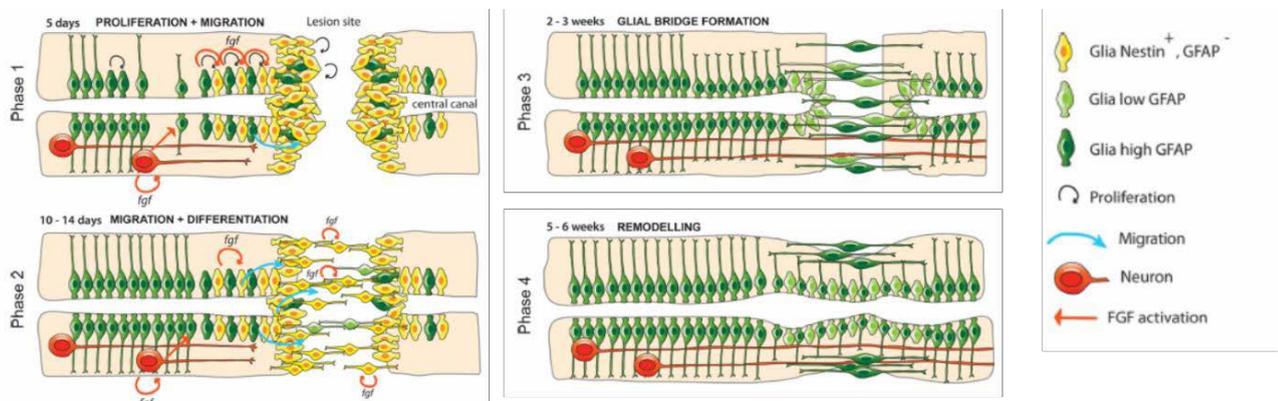


Figure 27 : Modèle de régénération de la moelle épinière chez le poisson zèbre. Adapté de Goldshmit et al., 2012.

La transection de la moelle épinière stimule la sécrétion de ligands Fgf (également sécrété par les neurones) dans le canal central qui va à son tour induire la dédifférenciation de cellules épendymogiales et leur prolifération pour générer des cellules progénitrices. Ces cellules migrent vers le site de lésion, elles expriment alors faiblement la GFAP (phase 1). Dix jours après la lésion, les cellules positives à la Nestine augmentent le niveau d'expression de la GFAP et maintiennent l'expression de Fgf. La migration est initiée et les cellules gliales commencent à s'allonger, à acquérir une morphologie bipolaire et à occuper le site de lésion. A ce stade, la régénération des axones est en cours dans la direction du site de lésion (phase 2). Deux à trois semaines après la lésion, les glios bipolaires ont formé un pont entre les deux sites de coupures, permettant la régénération et la migration axonale (phase 3). Cinq semaines après la lésion, le canal central a été complètement reconstruit, les cellules gliales bipolaires sont présentes uniquement à la surface. Les axones s'étendent maintenant à travers l'ancien site de lésion (phase 4). Mokalled et al. ont mis en évidence que la protéine de matrice cellulaire CTGF (connective tissue growth factor) est nécessaire et suffisante pour stimuler la formation du pont

glial (Mokalled et al., 2016). Ctgfa est induite dans et autour des cellules gliales qui participent à la formation du pont glial. L'inactivation de ctgfa empêche la régénération de la moelle épinière, sa surexpression accélère la formation du pont et la régénération de cette structure. De manière intéressante, l'utilisation d'une protéine humaine recombinante CTGF permet également d'accélérer le processus de régénération via la formation d'un pont glial.

2.4 Facteurs jouant un rôle dans la régénération de la moelle épinière

Même si les cascades moléculaires menant à la régénération de la moelle épinière ne sont pas aussi bien détaillées que celles impliquées dans la régénération de la rétine chez le poisson zèbre, des études récentes commencent à mettre en lumière certains facteurs ou voies de signalisation pouvant jouer un rôle important dans la régénération de cette structure.

Un des facteurs le plus précocement activé au cours de la régénération de la moelle épinière est Sox2, qui est requis pour induire la prolifération des cellules épendymaires (Ogai et al., 2014). Sox11b est également activé dans les cellules épendymogliales. Ce facteur est nécessaire pour leur prolifération et la récupération de la fonction locomotrice à la suite d'une lésion de la moelle (Guo et al., 2011).

Les gènes de la voie Notch sont aussi activés dans les cellules épendymogliales mais ont pour effet de réduire la prolifération de ces cellules, fonction similaire à celle qu'ils occupent dans la rétine à la suite d'une lésion (Dias et al., 2012). Cependant les variations de l'expression de Notch n'ont pas d'effet sur les cellules épendymogliales en condition homéostatique, ce qui suggère que la quiescence de ces cellules est maintenue par un mécanisme différent que dans les autres régions du système nerveux central.

La voie de signalisation Wnt/ β caténine est également activée dans des fibroblastes présents au niveau du site de lésion. Cela induit l'expression de col12a1a/b et le dépôt de collagène XII au niveau du site de lésion, nécessaire aux axones pour se diriger dans un environnement non-neural (Wehner et al., 2017).

A la suite d'une lésion, les monoamines dopamine et sérotonine induisent de manière indépendante la génération de motoneurones des deux côtés de la lésion avec une production plus importante de motoneurones du côté rostral de la lésion (Reimer et al., 2013; Barreiro-Iglesias et al., 2015).

2.5 La régénération de la moelle épinière est peu efficace chez les mammifères

Chez les mammifères, la lésion de la moelle épinière induit une perte significative de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes ainsi que l'augmentation et le recrutement de cellules au site de lésion (Johansson et al., 1999; Barnabé-Heider et al., 2010; Horky et al., 2006; Lytle and Wrathall, 2007; Göritz et al., 2011). Tout comme chez le poisson zèbre, les cellules épendymaires, qui se divisent normalement rarement, augmentent de près de 50 fois leur taux de prolifération un jour après la lésion (Johansson et al., 1999). Trois jours après la lésion, les descendants des cellules épendymaires commencent à quitter la région du canal central et à migrer vers le site de lésion (Johansson et al., 1999; Meletis et al., 2008; Mothe and Tator, 2005). L'expression de marqueurs de cellules épendymaires, comme Sox2, Sox3 et FoxJ1 (Forkhead box protein J), diminue au sein de ces cellules, la plupart d'entre elles commencent à exprimer des marqueurs d'astrocytes et à contribuer à la formation d'une cicatrice gliale (Meletis et al., 2008). Les astrocytes, qui dérivent donc des cellules épendymaires, demeurent au centre de la cicatrice gliale entourés de cellules stromales de type fibroblastes, cela forme le cœur de la cicatrice gliale (Camand et al., 2004; Barnabé-Heider et al., 2010). Les cellules stromales dérivent d'un sous-groupe de péricytes², appelés les péricytes de type A. Ces péricytes prolifèrent activement à la suite d'une blessure, puis les cellules filles quittent la paroi des vaisseaux et se différencient en cellules stromales qui produisent de la matrice extracellulaire fibreuse. La génération de cellules stromales par les péricytes est nécessaire pour obturer la lésion et retrouver une intégrité tissulaire (Göritz et al., 2011).

Les astrocytes dérivant des cellules épendymaires ont un phénotype différent de ceux obtenus par auto-renouvellement et seule une petite fraction d'entre eux expriment la GFAP (Meletis et al., 2008). Ces cellules constituent plus de la moitié des nouveaux astrocytes présents dans la cicatrice gliale (Barnabé-Heider et al., 2010). Les bords de la cicatrice gliale sont constitués d'astrocytes générés par auto-renouvellement de ceux déjà présents dans la moelle épinière (**figure 28**).

² Les péricytes sont des cellules murales localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires.

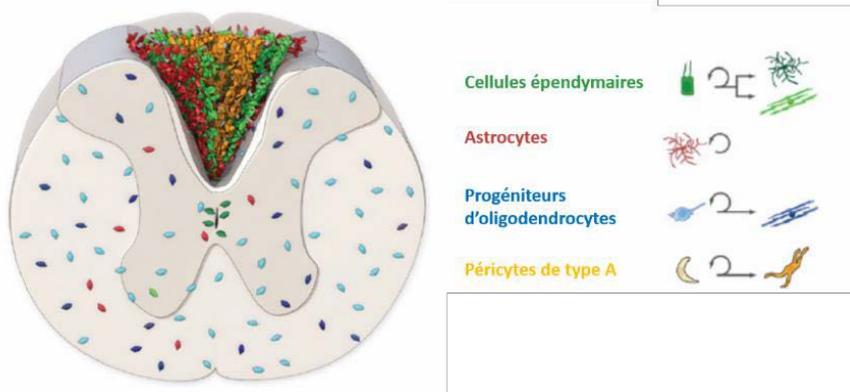


Figure 28 : Distribution des cellules générées à partir de cellules épendymaires (en vert), d'astrocytes (en rouge), de progéniteurs d'oligodendrocytes (en bleu) et de péricytes de type A (en jaune) 4 mois après une incision dorsale de la moelle épinière de mammifère.

Adapté de Sabelström et al., 2014.

La vaste majorité des oligodendrocytes générés à la suite d'une lésion dérive des progéniteurs d'oligodendrocytes, mais une petite population d'entre eux est générée à partir de cellules épendymaires (Meletis et al., 2008; Barnabé-Heider et al., 2010). Aucun nouveau neurone n'est généré *in vivo*, toutefois les cellules épendymogliales de rongeurs ont la capacité de générer des neurones *in vitro* (Barnabé-Heider et al., 2010).

La cicatrice gliale formée à la suite d'une lésion de la moelle épinière a pendant longtemps été perçue comme un simple obstacle à la régénération axonale. Les astrocytes de la cicatrice gliale produisent des facteurs inhibiteurs, comme les chondroïtine sulfates de la matrice extracellulaire, qui empêchent les axones de croître au travers de la cicatrice (Burda and Sofroniew, 2014). Cependant, l'ablation des astrocytes de la cicatrice gliale peut affecter l'infiltration des cellules immunitaires et peut mener à un volume de lésion plus important et à une augmentation de la mort neuronale suggérant un rôle positif à cette cicatrice gliale. Lorsque la prolifération des cellules épendymaires est bloquée, la cicatrice gliale ne se forme pas, des kystes se forment au niveau du site de lésion, la lésion s'étend et la perte de neurones augmente (Sabelström et al., 2013). De plus, les descendants des cellules épendymaires sont nécessaires à la production de facteurs neurotrophiques qui aident à la survie neuronale après les lésions faites au CNS (Sabelström et al., 2013).

L'étude de Nomura et al. montre que des cellules gliales peuvent migrer à travers un tunnel de chitosane greffé, former un pont et guider ainsi la régénération des axones chez le rongeur à la suite d'une lésion (Nomura et al., 2010). C'est une réponse à la blessure similaire au mécanisme de régénération observé chez le poisson zèbre (Goldshmit et al., 2012; Mokalled et al., 2016).

3. Réactivation des progéniteurs latents chez les rongeurs

Dans le cerveau des mammifères, des études récentes ont révélé que d'autres populations de cellules possèdent des propriétés de progéniteurs latents.

A la suite d'une ischémie causant des dommages dans le striatum et le cortex cérébral chez la souris, les cellules épendymaires au niveau de la SVZ perdent leurs caractéristiques de cellules épendymaires, entrent en division et génèrent des neuroblastes et des astrocytes (Carlén et al., 2009). Ce mécanisme est dépendant de la voie Notch. En effet, en conditions physiologiques, l'inhibition de cette voie de signalisation permet aux cellules épendymaires de se diviser et de produire des neurones du bulbe olfactif alors que sa suractivation est suffisante pour bloquer la réponse des cellules épendymaires à la suite d'une lésion (Carlén et al., 2009).

Certains astrocytes présents au niveau du parenchyme ont une capacité intrinsèque à générer des neurones. Bien que cette capacité soit dormante, elle a été mise en évidence en stimulant ces astrocytes par des facteurs de croissance *in vitro* (Buffo et al., 2008; Shimada et al., 2012; Sirko et al., 2013). Récemment, il a été montré que certains astrocytes du striatum peuvent produire des neurones *in vivo* chez la souris à la suite d'une ischémie (Magnusson et al., 2014) ou d'une injection d'acide quinolinique (Nato et al., 2015).

IV- Inflammation : un processus aux conséquences différentes selon les espèces.

L'inflammation est la première réponse à une lésion dans la plupart des tissus. Pourtant, elle n'implique pas les mêmes conséquences en termes de réparation neuronale chez les mammifères et chez les téléostéens. Même si ce sujet n'est pas au cœur de mon travail de thèse, j'ai choisi de finir mon introduction avec quelques considérations sur ce sujet.

Un mécanisme d'auto-défense et de survie peut avoir des résultats positifs ou négatifs en fonction du déroulement temporel des événements, des types cellulaires impliqués et de la sévérité de la lésion dans le tissu (Kizil et al., 2015). Les différentes phases de la réaction inflammatoire sont bien définies (**figure 29**).

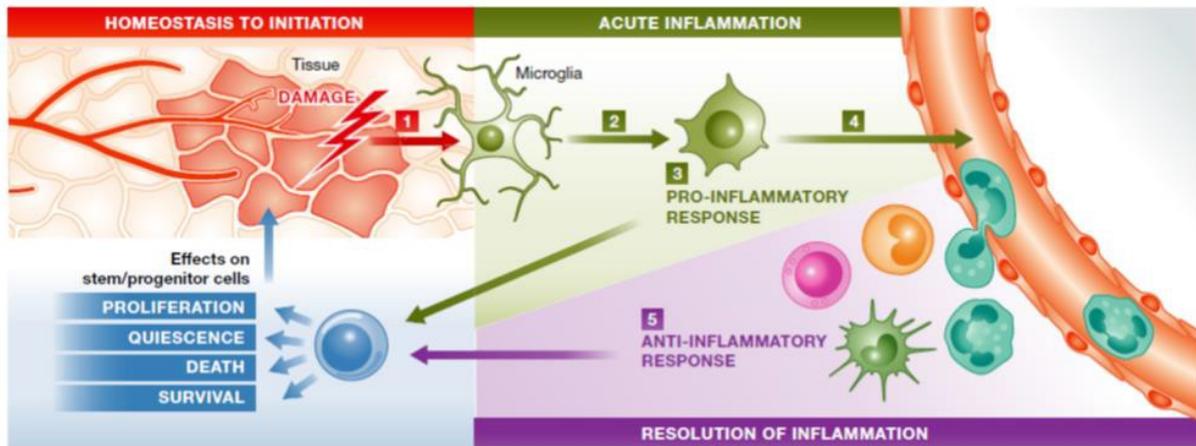


Figure 29 : Schéma simplifié de l'initiation et de la résolution de l'inflammation en six étapes (Kizil et al., 2015).

(1) Lorsqu'un tissu voit son état homéostatique compromis, il initie un processus d'inflammation à travers des signaux d'endommagements (apoptose, molécules de signalisation cytokines). (2) La perturbation de l'homéostasie provoque alors une transformation morphologique et fonctionnelle des macrophages locaux (en vert). (3) L'inflammation aiguë est initiée par la sécrétion de plusieurs chimiokines (cytokines dont la fonction principale est d'attirer les leucocytes sur le site inflammatoire, à l'endroit où elles sont produites) et de cytokines pro-inflammatoires comme $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ (Interleukin-1 β), $IL-6$ et $MCP-1$ (Monocyte Chemoattractant Protein-1). (4) L'inflammation aiguë permet le recrutement de cellules immunitaires périphériques ce qui augmente le potentiel inflammatoire par la sécrétion d'autres facteurs pro-inflammatoires. (5) Les cellules immunitaires participent aussi à une résolution active de l'inflammation à travers la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires comme $IL-4$, $IL-10$, $C5a$ (Complement component 5a), $IFN-\gamma$ (interféron gamma), $TGF-\beta$ et NO (Nitric oxide). (6) Les progéniteurs/cellules souches (en bleu) sont sous l'influence du milieu inflammatoire.

Chez les mammifères, à la suite d'une lésion du système nerveux central, les microglies sont les premières cellules à être activées. Ce sont des cellules gliales d'origine mésodermiques qui jouent le rôle de macrophages dans le CNS. Elles migrent vers le site de lésion, initient une réaction gliale plus importante et communiquent avec le système immunitaire (Hanisch and Kettenmann, 2007). Les glies NG2 réagissent aussi assez précocement en augmentant leur prolifération (Kang et al., 2010; Simon et al., 2011). Les astrocytes sont la dernière population de cellules à réagir par des changements multiples de morphologie, d'expression et de fonction

de gènes selon un processus appelé astrogliose. L'astrogliose est induite sous différentes conditions de lésions du cerveau, que ce soit par dégénération, ischémies ou traumatismes. En devenant hypertrophiques, les astrocytes remplissent la plaie, augmentent l'expression des protéines de filament intermédiaire comme GFAP et Vimentine, et déposent de la matrice extracellulaire qui entrave la régénération (Burda and Sofroniew, 2014). Pourtant, dans un premier temps, cette réaction a des effets bénéfiques, elle a un rôle de protection lorsque la barrière hémato-encéphalique est rompue et permet l'entrée et la persistance de cellules inflammatoires au niveau du site de lésion (Robel et al., 2011).

Il n'y a pas d'astrocytes dans le cerveau de poisson zèbre. Cependant, de larges blessures, en particulier celles réalisées à travers la boîte crânienne et qui permettent l'invasion du liquide cébrospinal dans le parenchyme, provoquent une augmentation de l'expression de GFAP dans les glies radiaires du pallium de poisson zèbre mais sans pour autant de formation de cicatrice gliale (März et al., 2011; Kishimoto et al., 2012).

1. Rôle négatif de l'inflammation sur les cellules souches neurales chez les mammifères

Plusieurs études indiquent que l'inflammation exerce une régulation négative sur la prolifération des cellules souches neurales en contexte non régénératif (Ek Dahl et al., 2003; Monje et al., 2003; Iosif et al., 2006). Dans un modèle d'occlusion cérébrale chez la souris, la réduction de l'activation de macrophages permet l'augmentation du nombre de nouveaux neurones générés au niveau de l'hippocampe (Liu et al., 2007b). L'étude du blocage de TNF α à son récepteur (Iosif et al., 2006, 2008), ou de la suractivation des cellules microgliales (Jakubs et al., 2008), montre que ces processus diminuent la prolifération de progéniteurs neuraux, leur différenciation en neurones, leur survie et leur intégration. Les cellules souches neurales expriment des récepteurs à la cytokine pro-inflammatoire INF- γ , qui est sécrétée principalement par les cellules T cytotoxiques, et qui va réduire la capacité de prolifération de ces cellules souches (Mäkelä et al., 2010). La cytokine anti-inflammatoire IL-10 maintient les cellules souches neurales dans un état prolifératif indifférencié au niveau de la SVZ de souris adulte aux dépens d'une différenciation neurogénique (Perez-Asensio et al., 2013). Cette observation pourrait expliquer partiellement pourquoi la neurogenèse régénérative n'a pas lieu à la suite de lésions chez les rongeurs alors que les cellules de la SVZ augmentent leur prolifération en réaction à la blessure (Ben-Hur et al., 2003). Les leucotriènes participent également à la suppression de l'activité des cellules souches neurales chez les rongeurs. Enfin, le blocage de

CYSLR1 (Cysteinil leukotriene receptor 1) par un antagoniste augmente la prolifération de ces cellules en culture de neurosphères de rat. (Huber et al., 2011).

2. Rôle positif de l'inflammation sur les cellules souches neurales chez les mammifères

Au contraire, certaines chimiokines impliquées dans le processus d'inflammation précoce semblent être essentielles pour le processus de neurogenèse régénérative. Ces cytokines peuvent indirectement participer à la remyélination, la néovascularisation et la neuroprotection qui sont des prérequis important pour la régénération du CNS après lésion (Jaerve and Müller, 2012). En culture de cellules, les cellules souches neurales ont besoin du signal chimioattractant de SDF1/CXCR4 (stromal-cell derived factor1/ CXC chemokine receptor 4) pour migrer vers la zone de lésion (Imitola et al., 2004). En réaction à une réponse immunitaire causée une infection bactérienne, la prolifération cellulaire de progéniteurs augmente au niveau de l'hippocampe chez des souris adultes (Wolf et al., 2009)

3. Inflammation dans le SNC de poisson zèbre

Dans le pallium de poisson zèbre adulte, la réponse inflammatoire est nécessaire à l'initiation de la régénération. L'analyse transcriptomique et par hybridation *in situ* de l'expression génique avant et après une lésion mécanique au niveau du pallium ont permis d'identifier plusieurs gènes candidats impliqués dans la réponse régénérative chez le poisson zèbre adulte (Kizil et al., 2012a; Rodriguez Viales et al., 2015). Gata3 est l'un d'entre eux. L'expression de ce facteur de transcription à doigts de zinc est rapidement induite dans les cellules gliales à la suite d'une lésion via la leucotriène C4 (LTC4) se liant à son récepteur Cyslrl1 (Kyritsis et al., 2012). Lorsque l'expression de Gata3 est bloquée, le processus de régénération est perturbé (Kizil et al., 2012a).

Le récepteur aux chimiokines Cxcr5, exprimé par les glies radiaires et les cellules périventriculaires, est également impliqué dans la réponse de neurogenèse régénérative (Kizil et al., 2012b).

OBJECTIF DE L'ETUDE

La neurogenèse régénérative a été étudiée chez le poisson zèbre dans plusieurs parties du système nerveux central. A ce jour, néanmoins, aucune étude de régénération cellulaire n'a été réalisée au niveau du cerveau moyen dorsal.

Pourtant, l'une des premières études de régénération neuronale chez les poissons téléostéens avait été réalisée dans le TO chez la carpe juvénile *Carassium carassium* par Kirsche et Kirsche dans les années 1960 (Kirsche and Kirsche, 1961, cité dans Kizil et al., 2012c). A la suite d'une lésion du TO, les auteurs avaient montré que la réponse cellulaire initiale consistait en une large dégénérescence neuronale et était suivie de la génération de nouvelles cellules. Pour déterminer si ces nouvelles cellules dérivent de zones de progéniteurs constitutives ventriculaires, qu'ils appellent « zones matrices », les auteurs avaient réalisé des lésions plus ou moins étendues de ces zones. Ils avaient trouvé une corrélation entre la taille des zones matrices préservées et le degré de restauration de l'architecture du tissu lésé.

Chez le têtard de *Xenopus laevis*, le tectum est capable de régénérer lorsqu'un lobe entier de cette structure est enlevé par chirurgie (Bernardini et al., 2010). A un stade larvaire précoce (stade 49/50), des expériences d'incorporation de BrdU montrent de nombreuses cellules en prolifération après ablation dans ce que les auteurs nomment là encore des zones matrices du cerveau moyen. La structure topographique du lobe régénéré est restaurée. A un stade larvaire plus tardif (stade 55/56), la régénération cellulaire semble provenir des zones matrices mais de manière plus limitée et de cellules quiescentes qui selon les auteurs ré-entrent dans le cycle cellulaire (Bernardini et al., 2010). De plus, chez les têtards tardifs, même si le tectum reste capable de régénérer, la topographie de cette région est complètement altérée après régénération.

Il semble donc que le tectum a la capacité de régénérer, peut-être avec une structuration en couches altérée. Toutefois, la nature des cellules à l'origine de cette réparation n'est pas précisée.

Chez le triton adulte, l'injection de 6-hydroxydopamine dans le ventricule induit la mort de neurones dopaminergiques dans le cerveau moyen, qui sera suivie de leur complète régénération (Berg et al., 2010). Des cellules épendymogliales quiescentes sont présentes tout le long du ventricule du cerveau moyen. A la suite de la mort de neurones, ces cellules

épendymaires ré-entrent dans le cycle cellulaire, prolifèrent et se différencient en neurones manquants (Parish et al., 2007; Berg et al., 2010).

L'intérêt particulier du TO des téléostéens est qu'il présente à sa périphérie une zone de progéniteurs de type neuroépithéliaux qui va générer des neurones et des cellules épendymogliales présentes tout le long du ventricule de cette structure. Comme cet organe semble capable de régénérer, il pourrait être un modèle intéressant pour étudier le recrutement de progéniteurs. Les cellules épendymogliales ont-elles une capacité de progéniteurs latents ? Des progéniteurs neuroépithéliaux peuvent-ils participer à la neurogenèse régénérative ? En effet, lorsque j'ai débuté mon doctorat, la seule étude réalisée sur la régénération dans le cerveau de poisson zèbre portait sur le télencéphale, il n'y avait aucune donnée sur le rôle des progéniteurs neuroépithéliaux en contexte de régénération.

Au début de ma thèse, j'ai entrepris de mettre au point des outils génétiques nécessaires à l'étude de la régénération dans le tectum (Résultats – Chapitre 1). Le cœur de ma thèse a été d'étudier quels types de progéniteurs pouvaient être à l'origine de la régénération cellulaire du tectum de poisson zèbre, ce qui fait l'objet d'un article en préparation (Résultats – Chapitre 2). J'ai pour cela mis au point différentes techniques permettant d'induire la mort neuronale chez la larve (Résultats – Chapitre 3) et chez l'adulte (Résultats – Chapitre 2).

RESULTATS

CHAPITRE 1 – CRIBLE DE SEQUENCES REGULATRICES ACTIVES DANS LES CELLULE DU TOIT OPTIQUE

I- Introduction

Au début de ma thèse, nous ne disposions pas de lignées transgéniques de poisson zèbre permettant de visualiser des types cellulaires distincts dans le tectum chez la larve et chez l'adulte. Pour étudier la régénération neuronale et les progéniteurs impliqués, j'avais besoin de créer des outils transgéniques permettant (1) de visualiser des neurones du TO et ainsi suivre leur mort et leur remplacement et (2) visualiser les progéniteurs du TO pour comprendre leur rôle éventuel dans la neurogenèse régénérative. Dans ce but, j'ai réalisé un crible de séquences régulatrices.

1. Choix des séquences régulatrices à tester

Afin d'identifier des séquences régulatrices actives dans le toit optique, j'ai exploité la base de données Vista Enhancer Browser (https://enhancer.lbl.gov/frnt_page_n.shtml). Il s'agit d'un centre de ressources recensant des séquences non codantes évolutivement conservées entre vertébrés dont l'activité est évaluée chez la souris (Visel et al., 2007). Un vecteur d'expression qui produit une protéine rapportrice β -galactosidase sous l'effet combiné d'un promoteur minimal Hsp68 (Heat shock protein) et de la séquence régulatrice à tester est injecté dans des œufs fertilisés de souris. L'expression de l'activité de la séquence est visualisée au stade de développement embryonnaire E11.5 par une révélation au X-gal et annotée selon son patron d'expression. J'ai identifié une soixantaine de séquences régulatrices présentant une activité au niveau du colliculus supérieur, structure homologue au TO chez les mammifères. J'ai raffiné la liste en sélectionnant uniquement celles qui avaient le patron d'expression le plus spécifique au colliculus supérieur et ainsi obtenu une liste de 11 séquences non codantes dont les éléments orthologues de poisson zèbre ont été testés (**figure 30**).

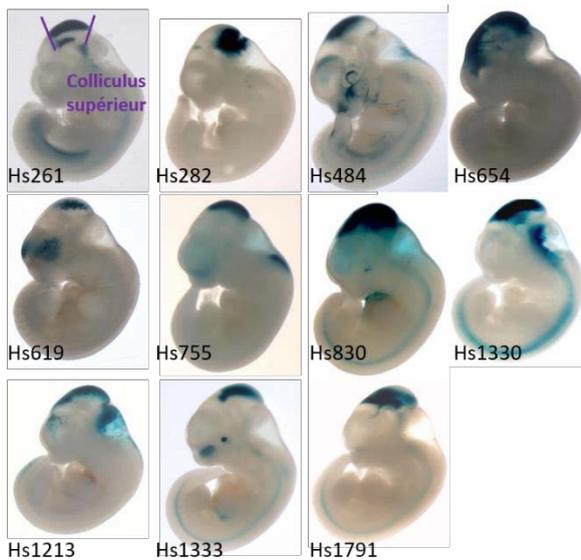


Figure 30 : Photo représentative de l'activité régulatrice (visualisée en bleu) chez un embryon de souris (stade E11.5) de chacune des 11 séquences non codantes évolutivement conservées sélectionnées pour mon crible.

2. Design du vecteur de transgénèse

Ces séquences non codantes pourraient être activées chez le poisson zèbre dans différentes populations cellulaires du tectum : dans des neurones, des cellules gliales, des progéniteurs ou bien une combinaison de ces types cellulaires. Dans l'hypothèse où seules des populations neuronales du tectum seraient ciblées, la séquence pourrait être utilisée pour étudier la régénération neuronale à la suite d'une ablation génétique et conditionnelle avec le système nitroréductase (NTR, codé par le gène *nfsB* d'*E. coli*)/métronidazole. L'enzyme NTR réduit les composés nitroimidazole (Lindmark and Müller, 1976) comme le métronidazole en cytotoxines qui induisent la mort cellulaire (Edwards, 1993). Cette technique a été utilisée avec succès chez le poisson zèbre pour étudier la régénération des cellules β du pancréas chez la larve (Curado et al., 2007; Pisharath et al., 2007) et chez l'adulte (Moss et al., 2009), des hépatocytes (Curado et al., 2007; Choi et al., 2014), des cardiomyocytes (Curado et al., 2007), des oocytes (White et al., 2011), des bâtonnets de la rétine (Montgomery et al., 2010), de différents sous-types de cônes (Fraser et al., 2013; Hagerman et al., 2016), de neurones bipolaires rétiniens (Ariga et al., 2010), de neurones dopaminergiques chez la larve (Godoy et al., 2015) et de motoneurones chez l'embryon (Ohnmacht et al., 2016). Pour rendre visible l'ablation et la régénération cellulaire, le gène *nfsb* est en fusion avec un gène codant pour une protéine fluorescente.

Dans mon vecteur d'expression, j'ai choisi la KillerRed, qui pourra être utilisée comme protéine fluorescente et comme méthode alternative pour induire la mort cellulaire. Cette protéine fluorescente rouge, obtenue par ingénierie à partir de la GFP (Green fluorescent protein), présente des pics d'excitation et d'émission maximum respectivement à 585 et 610 nm (Bulina

et al., 2006). Sous une illumination intense et prolongée, les protéines fluorescentes subissent des transformations significatives et perdent leurs propriétés de fluorescence (photo-blanchiment). La KillerRed présente des propriétés de photo-cytotoxicité supérieure aux autres protéines fluorescentes, de l'ordre de 1000 fois plus comparée à la GFP. En effet, elle génère des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, Reactive oxygen species) toxiques au cours du photo-blanchiment. Chez le poisson zèbre, une KillerRed modifiée avec un signal d'adressage membranaire (mKR), a été utilisée de manière efficace pour induire la mort cellulaire, dans le cerveau postérieur et dans le cœur chez l'embryon de manière dose dépendante (Teh et al., 2010). Très récemment, l'utilisation de la microscopie à feuille de lumière a permis de réussir plus rapidement la lésion de cellules spécifiques et d'améliorer la survie de l'animal (Buckley et al., 2017).

Le vecteur d'expression que j'ai utilisé pour tester les séquences candidates chez le poisson zèbre contient donc un promoteur minimal Hsp70, le gène codant pour la nitroréductase, un peptide de clivage p2A et un gène codant pour la protéine KillerRed membranaire. Cela me permet d'avoir deux systèmes pour détruire spécifiquement des cellules et de choisir le plus efficace. Il contient également un gène codant pour la CFP sous l'action du promoteur β -cristalline de poisson zèbre et qui sert de contrôle positif d'intégration du transgène.

II- Résultats

J'ai analysé l'activité des vecteurs d'expression en F0 entre 2 et 4dpf. Sur les 11 séquences testées chez le poisson zèbre, 4 présentaient une activité au niveau du SNC dont 2 semblaient spécifiques du TO en F0. J'ai établi des lignées transgéniques stables à partir de ces 2 transgènes *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* et *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)*.

1. L'élément Dr282 est actif dans des progéniteurs du tectum et dans des cellules différenciées d'autres régions du cerveau.

J'ai analysé l'expression de la mKR dans la lignée *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* sur des larves F1 (3 dpf) soumis à un bain d'EdU pendant 4 heures. L'EdU (5-éthynyl-2'-deoxyuridine) est un analogue de la thymidine qui s'intègre dans les brins d'ADN en cours de synthèse. A ce titre, il est très communément utilisé pour marquer les cellules en phase S dans un tissu. La mKR est présente dorsalement dans le TO (**figure 31A et B**). Une partie des cellules positives pour la mKR est également marquée à l'EdU ce qui indique qu'elles sont en prolifération (**figure 31A4 et B4**, flèches jaunes). Par ailleurs, j'ai observé une expression de la mKR au niveau de l'épiphyse (**figure 31 A1, A4**).

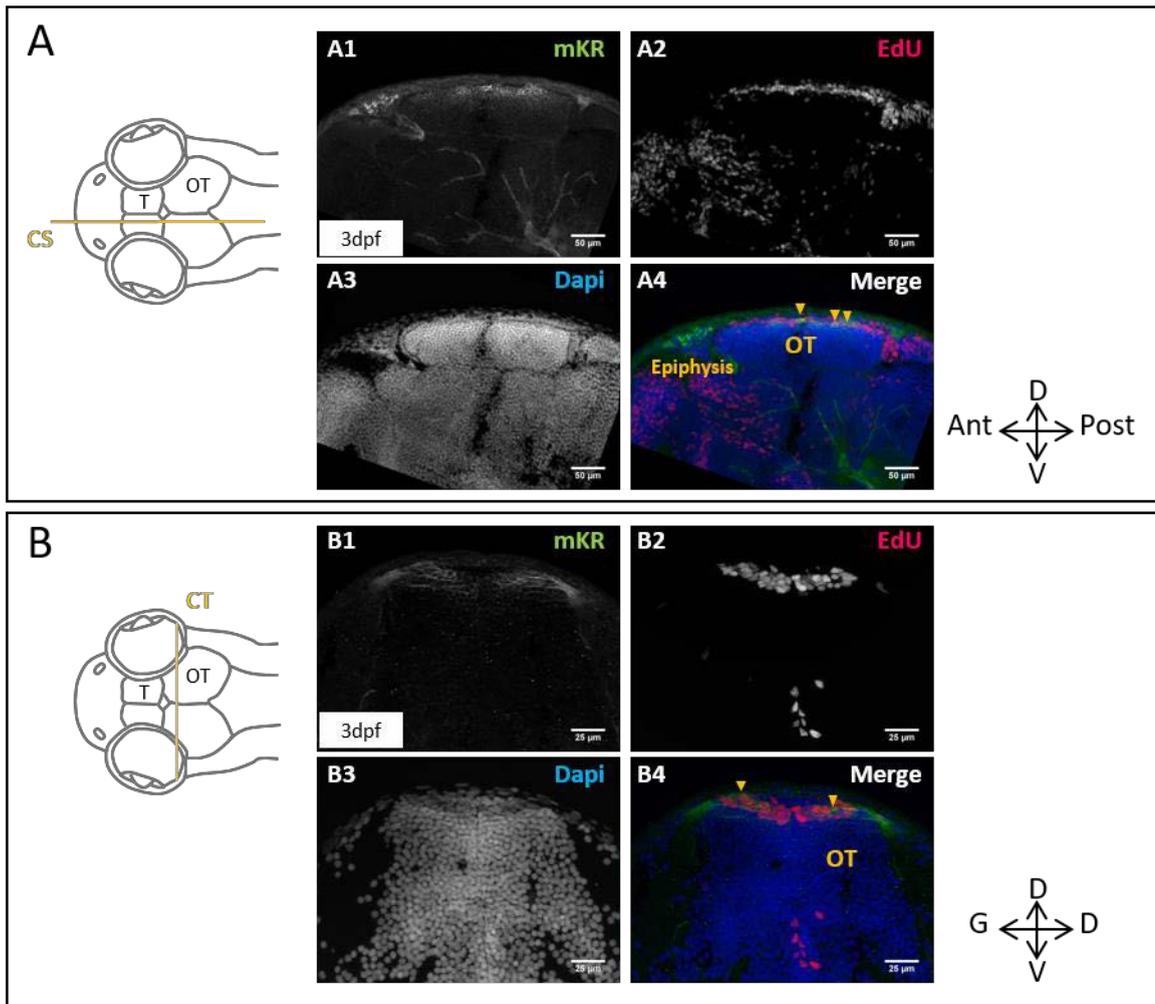


Figure 31 : Patron d'expression de la lignée *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* au stade larvaire 3 dpf. L'expression de la mKR correspond à la zone de prolifération du TO. Les pointes de flèches jaunes indiquent quelques cellules doublement marquées mKR/EdU.

- A. Coupes sagittales au niveau du cerveau moyen de *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* à 3dpf. A1. Immuno-marquage anti-mKR, A2. Marquage EdU, A3. Marquage nucléaire (DAPI), A4. Merge.
- B. Coupes transversales au niveau du cerveau moyen de *Tg(dr282:nfsB-p2A-mKR)* à 3dpf. B1. Immuno-marquage anti-mKR, B2. Marquage EdU, B3. Marquage nucléaire (DAPI), B4. Merge.

CS : coupe sagittale, CT : coupe transversale, OT : optic tectum, T : telencephalon

Au stade adulte, la mKR est présente dorsalement à la marge du TO (**figure 32A**). Après immuno-marquage avec un anticorps anti-HuC/D (marqueur pan-neuronal), j'ai observé une absence de colocalisation suggérant que les cellules marquées par la mKR dans cette région ne sont pas des neurones (**figure 32A**). La mKR est également visible au niveau d'une région fibreuse adjacente au raphe supérieur, donc certainement exprimée par des neurones différenciés (**figure 32B**).

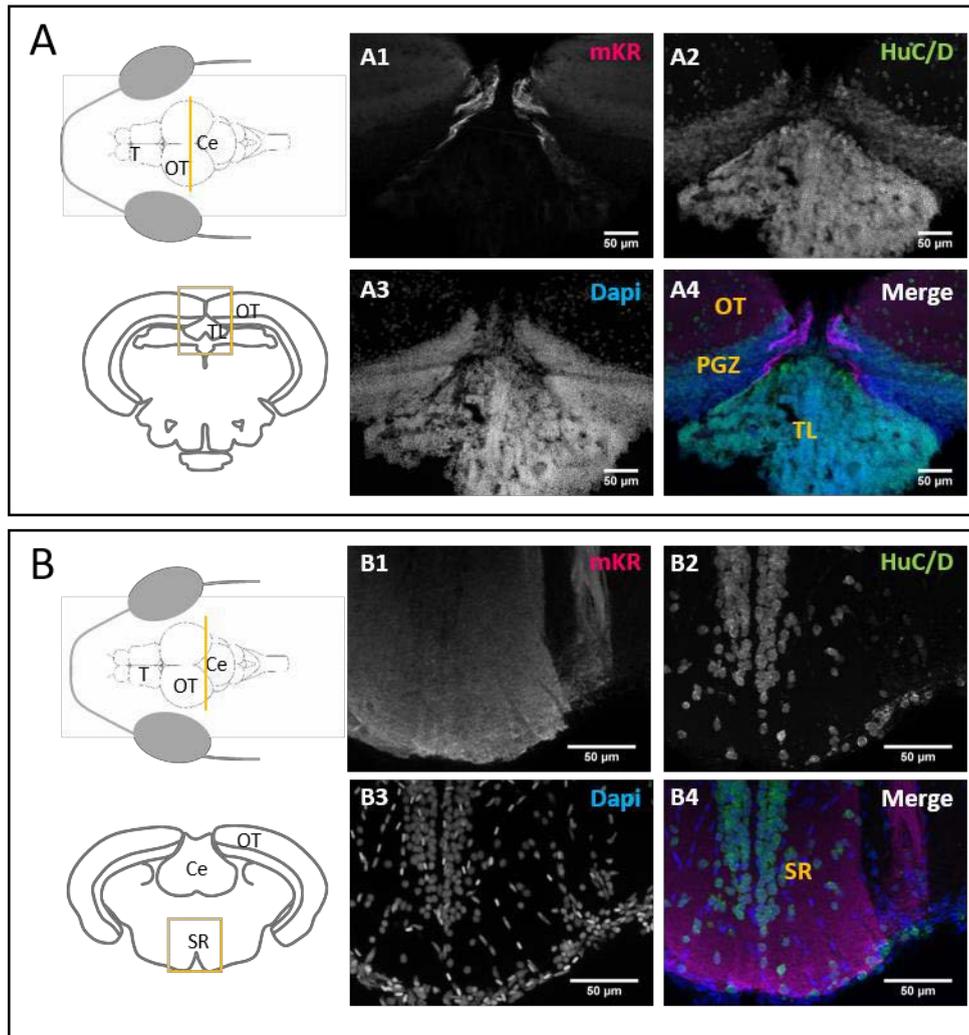


Figure 32 : Patron d'expression de la lignée *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* chez le poisson zèbre adulte à deux niveaux de coupes transversales du cerveau moyen (A et B).

A1 et B1. Immuno-marquage anti-mKR, A2 et B2. Immuno-marquage anti Huc/D, A3 et B3. Marquage nucléaire (DAPI), A4 et B4. Merge.

Ce : cerbellum, OT : optic tectum, PGZ : periventricular grey zone, SR : superior raphe, T : telencephalon, TL : torus longitudinalis.

Dans la lignée *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)*, l'expression de la mKR au niveau du tectum semble restreinte au niveau de la zone de prolifération tectale (TPZ) chez la larve comme chez l'adulte. Toutefois, l'expression de la mKR n'est pas limitée au TO. J'ai choisi de ne pas poursuivre la caractérisation de cette lignée. En effet, cette séquence régulatrice ne conduit pas à l'expression de protéine fluorescente dans des neurones donc la lignée transgénique ne peut pas être utilisée pour induire la mort neuronale. De plus, l'expression de protéine fluorescente n'est pas localisée dans la zone de progéniteurs du TO, je ne pourrai pas utiliser cette séquence régulatrice pour déterminer la contribution des progéniteurs constitutifs du tectum après lésion. .

2. L'élément Dr830 est actif dans les progéniteurs du TO

J'ai analysé l'expression de la mKR dans la lignée *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)* à 3 dpf (**figure 33**) et chez l'adulte (**figure 34**). Au stade 3 dpf, la mKR est exprimée à la périphérie du TO et dans la PML (**figure 33A**). A la suite d'un bain de 4 heures avec de l'EdU, certaines cellules positives à la mKR présentent un noyau marqué à l'EdU (**figure 33D**).

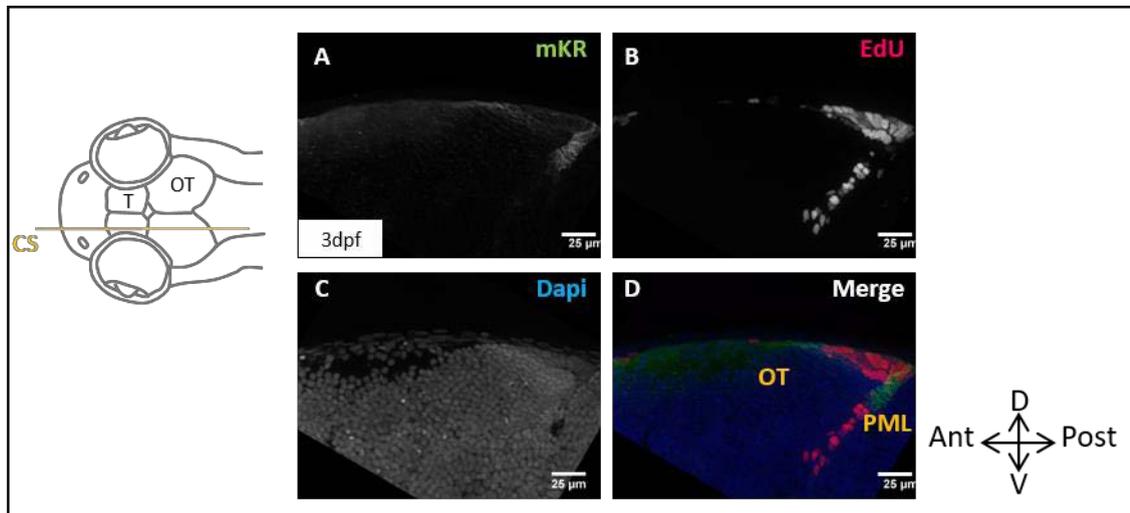


Figure 33 : Patron d'expression de la lignée *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)* au stade embryonnaire 3 dpf sur coupe sagittale au niveau du cerveau moyen. A. Immuno-marquage anti-mKR, B. Marquage EdU, C. Marquage nucléaire (DAPI), D. Merge.

OT: optic tectum, PML: peripheral midbrain layer.

Chez l'adulte, l'expression de la mKR est toujours localisée à la périphérie du TO (**figure 34 – A et B**). A un niveau de coupe postérieur du TO, la mKR est visible au niveau de la PML (**figure 34B4**, la PML est délimitée par des pointillés jaunes). Elle n'est pas colocalisée pas avec le marqueur HuC/D.

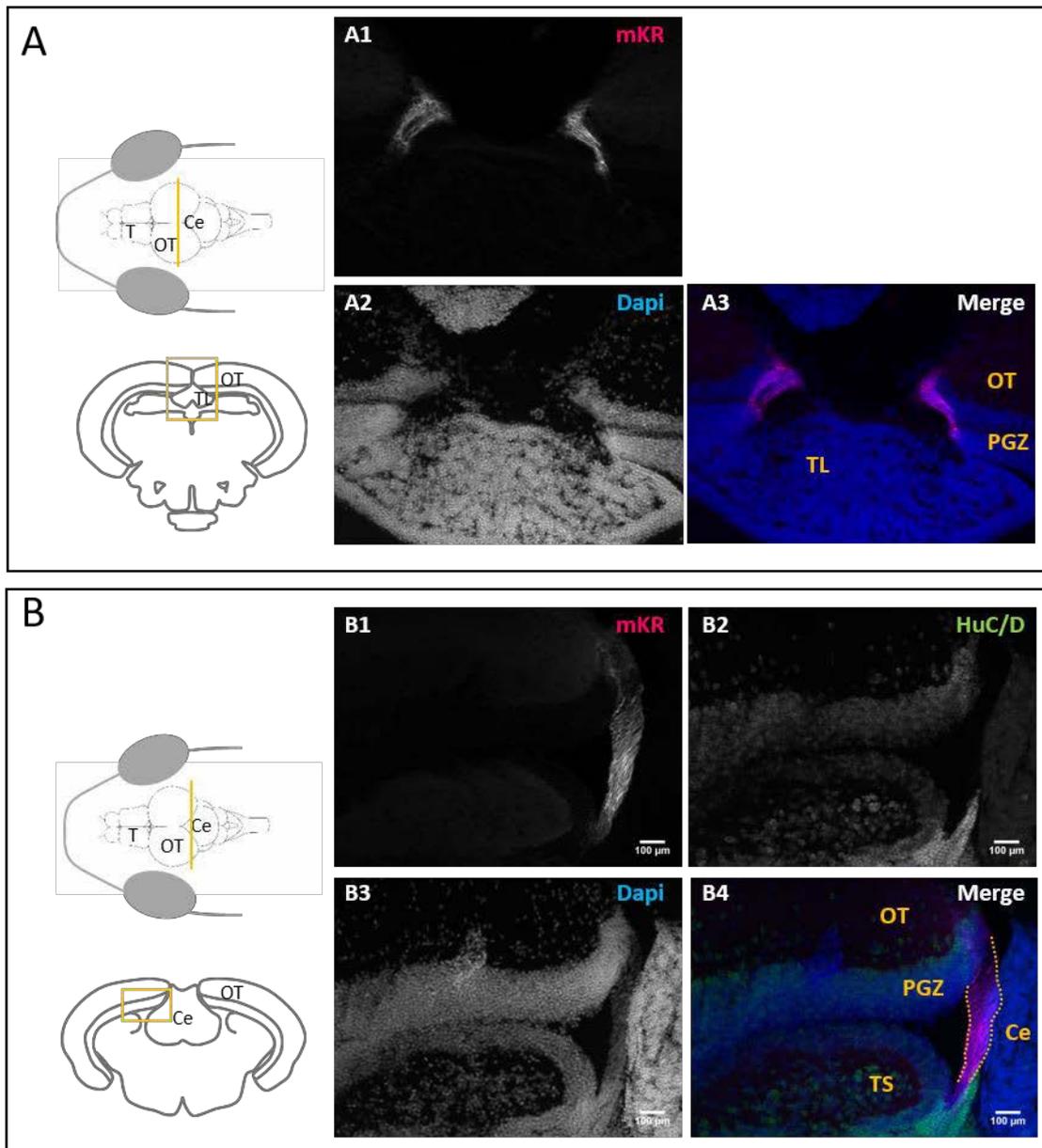


Figure 34 : Patron d'expression de la lignée *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)* chez le poisson zèbre adulte à deux niveaux de coupes transversales du cerveau moyen (A et B).

A1 et B1. Immuno-marquage anti-mKR, A2 et B2. Immuno-marquage anti Huc/D, A3 et B3. Marquage nucléaire (DAPI), A4 et B4. Merge.

Ce : cerbelle, OT : tectum optique, PGZ : zone grise périventriculaire, T : tectum, TL : torus longitudinalis, TS : torus semi-circulaire.

Chez la larve et l'adulte, l'expression de la mKR de la lignée *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)* est restreinte à la zone de prolifération du tectum (TPZ) et au niveau de la PML, régions où résident les progéniteurs constitutifs du TO. Cette séquence régulatrice présente donc un intérêt majeur pour la suite du projet. En effet, l'enhancer Dr830 pourra être utilisé comme marqueur de progéniteurs constitutifs et ainsi déterminer son implication ou non dans la neurogenèse

régénérative du tectum. Une caractérisation plus complète avec les lignées *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* et *Tg(Dr830:ERT2-Cre-ERT2)* est présentée dans le chapitre 2.

CHAPITRE 2 – ETUDE DE LA REGENERATION NEURONALE DU TOIT OPTIQUE CHEZ LE POISSON ZEBRE ADULTE

I- Article en préparation

Aurélie Heuzé¹, Matthieu Simion¹, Camille Pichon¹, Jean-Michel Hermel¹, Franck Bourrat¹, Jean-Stéphane Joly¹, Alessandro Alunni¹.

- 1- INRA CASBAH Group, Neurosciences Paris Saclay Institute, CNRS, Université Paris Saclay, Université Paris-Sud, Gif sur Yvette, France
- 2- ZEN Group, CNRS, Institut Pasteur, Paris, France

INTRODUCTION

Regeneration is not efficient in the mammalian brain. Although new neurons are produced after injury, a scar creates an inhibitory environment for the long-term survival of newly born neurons. In contrast to mammals, fish exhibit a high capacity for neuronal regeneration after injury (Becker et al., 1997; Kaslin et al., 2008; Reimer et al., 2008; Kroehne et al., 2011; Baumgart et al., 2012; Kishimoto et al., 2012; Alunni and Bally-Cuif, 2016; Kaslin et al., 2017). Furthermore, adult neurogenesis is pronounced, a trait which accounts, at least in part, for the continuous growth of the adult teleost brain. Moreover, in fish, new neurons are generated in most brain subdivisions and not only two telencephalic domains as in mammals (Zupanc and Horschke, 1995; Zikopoulos et al., 2000; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Pellegrini et al., 2007).

Two main types of neural progenitors are found in the zebrafish brain: radial glial (RG) and neuroepithelial (NE) cells. Previous studies showed that these two types of progenitors are involved in the regenerative process.

In the teleost pallium, new lateral RG cells are generated by NE cells of the lateral pallium (Dirian et al., 2014). Neurogenic RG cells are self-renewing and multipotent (Chapouton et al., 2010; März et al., 2010; Rothenaigner et al., 2011). Upon physical injury by a stab lesion, RG cells proliferate more actively, give rise to neuroblasts migrating to the site of injury, where they differentiate in neurons (Kroehne et al., 2011; Barbosa et al., 2015). In the telencephalon, regeneration seems to be complete after 100 days as demonstrated by the presence of the different types of mature neurons (Kroehne et al., 2011).

The zebrafish cerebellum contains stem and progenitor cells with different capacities to generate neurons and glia. The NE cells remain active in the adult brain where they give rise to the granule cells. In contrast, the RG cells are exhausted in the adult brain and produce only a small number of inter-neurons, Bergmann glia and oligodendrocytes (Kaslin et al., 2009, 2013). Conditional lineage tracing showed that regeneration is supported only by NE cells. Radial glia-like cells play a minor role in adult cerebellar neurogenesis and in recovery after injury. In contrast to telencephalon, cerebellum can regenerate one type cell. Thus cell recovery is partial: the granule cell layer seems intact while the molecular and Purkinje layers do not increase significantly following wound healing (Kaslin et al., 2017).

In addition, some regenerative responses recruit latent progenitors. In the adult zebrafish spinal cord, despite few proliferative progenitors (Zupanc et al., 2005; Park et al., 2007), high numbers of neurons are generated after a lesion. Lineage tracing identifies olig2 ependymogial radial cells, which are found in the ventrolateral domain in the ependyma as likely progenitor cells for motor neurons (Reimer et al., 2008). Finally, retina regeneration can involve constitutive progenitors or recruit initially silent progenitors. Retinal stem cells are found at the periphery, close to the ciliary epithelium, in a region called the ciliary marginal zone (CMZ). In addition to these CMZ stem cells, Muller glia cells, distributed all over the differentiated retina, produce new rod photoreceptors under homeostatic conditions. Different lineage tracing studies identified the Muller glia cells as the source of retinal progenitor cells responsible for regenerating retinal neurons in the damaged zebrafish retina (Bernardos and Raymond, 2006; Fausett and Goldman, 2006; Bernardos et al., 2007; Fimbel et al., 2007; Ramachandran et al., 2010b). Interestingly, in another non mammalian vertebrate model, *Xenopus tropicalis*, the CMZ is involved in retinal regeneration (Miyake and Araki, 2014). Responses of different progenitor types might depend on the types of injury, more or less important and close to the periphery.

All these results show that in the adult brain, stem cell heterogeneity underlies different responses to injury. In this paper, we decided to study the regenerative process in a less studied brain region, the optic tectum (OT), which is the main retinorecipient brain region, homologous to the superior colliculus in mammals.

OT continuously expands from a growth zone located at its margin called the tectal marginal zone (TMZ) ou tectal proliferative zone (TPZ). Morphogenesis of this layered structure occurs similarly to that of the retina (Joly et al., 2016), by a cellular conveyor belt, where cell types at different levels of differentiation are partitioned in concentric domains (Devès and Bourrat,

2012). Such a cell-type distribution facilitates the interpretation of experiments, one of the reasons why we believe that OT is a good model to provide an enhanced understanding of the strategies for neuronal repair. Surrounding the OT, a thin sheet of cells seals the tectal ventricle, joining the tectum and the torus semicircularis (Grandel et al., 2006). This zone is called the PML for posterior mesencephalic lamina or posterior midbrain layer. PML cells are slow-cycling polarized cells. They express stem cell markers such as *sox2* and *musashi1* (Alunni et al., 2010; Ito et al., 2010).

OT contains many ependymogial radial cells lining the ventricle. In contrast to the situation in the telencephalon, most OT RG are quiescent and neurogenic RG are only found at the periphery of the tissue (Galant et al., 2016). Using this original situation compared to others studied regions of the brain, we investigate whether regeneration involves the boosted proliferative activity of preexisting progenitors (such as the peripheral progenitors), or whether it implies *de novo* recruitment of dedifferentiated cells from local quiescent cells.

We first established standard OT mechanical lesion procedures. Histological analysis, EdU pulse chases and lineage tracing experiments showed that the regenerative process induces the proliferation of RG cells. More surprisingly, we also observed marginal proliferation activation of distal NE progenitors.

We generated and characterised a new neuroepithelial line expressing GFP under the control of a *meis2a* enhancer. Lineage tracing showed that these cells contribute to the formation of the OT and continue to produce glial and neuronal cells all along the life. Our conditional lineage tracing permanently labeling RG cells, show that these cells in the ventricle re-entry into the cell cycle to OT cells. Mediated Cre-loxP-based genetic lineage-tracing experiments are ongoing to determine the contribution of the NE progenitors in zebrafish OT regeneration.

MATERIALS AND METHODS

Fish husbandry

The following *Danio rerio* lines were used: wild-type strain AB, mutant strain Casper (White et al., 2008) and *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}* (Wang et al., 2011), *Tg(gfap:eGFP)* (Bernardos and Raymond, 2006), *Tg(her4:dRFP)* (Yeo et al., 2007), *Tg(her4:ERT2CreERT2)* (Boniface et al., 2009), *Tg(olig2:eGFP)* (Park et al., 2007) transgenic lines. Two other transgenic lines were established: *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* and *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* (see Plasmid construction for more details). Fish were raised according to a standard protocol (detailed in Affaticati et al., 2017). Embryos were kept at 28°C

and staged as described by Kimmel (Kimmel et al., 1995). All procedures were performed in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee (no. 59 CEEA).

Stab lesion assay

Adult fish (3-12 months old) from AB or Casper genetic backgrounds were used indifferently. Tectal lesions were performed on anaesthetized fish (0.016% Tricaine (A5040, Sigma)) with a 30 gauge canula (outer diameter 300 μm). The canula, 800 μm long, was pushed through the skull in a dorsal to ventral movement until the plastic holder touched the head. This procedure induced a lesion of identical depth from one fish to another.

Plasmid construction

pEXP-AMA plasmids were designed for transgenesis in fish (Amagen platform, Gif-sur-Yvette, France). They bear recognition sequences for the Tol2 transposase (Suster et al., 2009) to improve genomic integration. Moreover, they bear a transgenesis marker, consisting in the zebrafish β -crystallin promoter driving the CFP expression in the lens. Enhancers and promoters were inserted using Gateway Cloning Technology (Life technologies) and the desired reporter cloned in the vector via restriction/ligation.

The regulatory sequence Dr830 was amplified from genomic DNA with the primers 5'-GATGCATTCGCAGAGTTTCA-3' (forward) and 5'-GTCGAAAACACCCTGGCTTT-3'. This 865 pb fragment was inserted in the pEXP-AMA plasmid via Gateway technology.

The *nfsB* gene was amplified from the pCGAd2v45 plasmid (Guise et al., 2007) with the primers 5'-ATGGATATCATTTCTGTCGC-3' (forward) and 5'-CCTCGCCCTTGCTCACCCTTCGGTTAAGGTG-3' (reverse). The GFP gene was amplified with the primers 5'-CACCTTAACCGAAGTGGTGAGCAAGGGCGAGG- (forward) and 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCA-3' (reverse). NfsB and GFP fragments were fused using the primers 5'-ATGGATATCATTTCTGTCGC-3' (forward) and 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCA-3' (reverse). The primers provided 5'-NheI and 3'-NotI restriction sites for cloning. The fragment ERT2CreERT2 was synthesized by Genscript. NfsB-GFP and ERT2CreERT2 fragments were subcloned into pEXP-AMA-Dr830 plasmid via NheI/NotI restriction/ligation.

Transgenic lines *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* and *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* were obtained by coinjecting 1-cell stage embryos with a mix containing 15 ng/ μl of *pEXP-AMA-Dr830-nfsB-*

GFP and *pEXP-AMA-Dr830-ERT2CreERT2* and 15 ng/μl of *transposase* capped RNA. F0 adults were screened for transmission by crossing with wild type fish and recording fluorescence in F1 embryos.

Tamoxifen, EdU and BrdU treatments

4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, T176, Sigma) treatments of 2 dpf embryos and 5 dpf larvae were performed in embryo medium. Tank water was used to treat 2 mpf juveniles and adults (see table 1 for optimized conditions). Recombination in juvenile and adult fish was induced by incubating the fish during 9 hours/day for a period of four days. 4-OHT solution was renewed each day and fish were washed at least three times in fresh water before being transferred in their breeding tanks.

| Recombination stage | 4-OHT concentration | Time |
|----------------------------|---------------------|-------|
| 2 dpf | 10 μM | 24 h |
| 7 dpf | 10 μM | 48 h |
| 2 mpf juveniles and adults | 5 μM + 0.1% DMSO | 100 h |

Table 1. 4-OHT concentrations for *Tg(her4:ERT2CreERT2)* and *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* recombinations

For EdU experiments, fish were intraperitoneally injected with 10mM EdU (1 μl/20 mg body weight) and killed by over-anesthesia (0.2% Tricaine) four hours later. EdU was detected with the EdU Click-iT® Plus EdU Alexa Fluor® 633 Imaging Kit (Life Technologies), according to manufacturer's protocol.

To label cycling cells, fish were immersed in water containing 7.5 mM 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, B5002, Sigma) for four days. The solution was renewed every day. Fish were then washed several times with fresh water and transferred in their breeding tanks.

Histology

Brains were dissected out and fixed overnight in 4% formaldehyde in 1X phosphate buffered saline (PBS) at 4°C. After dehydration in increasing concentrations of ethanol and incubation in butanol, brains were embedded in parafin. Serial sections (8 μm) were prepared with a Leica rotary microtome and mounted according to standard procedures. Slices were rehydrated by incubation in xylene and ethanol solutions, and stained with cresyl violet solution. Sections were washed with glacial acetic and dehydrated with ethanol.

Immunohistochemistry

Brains were dissected out and fixed overnight in 4% formaldehyde in 1X PBS at 4°C. They were then embedded in 3% agarose in 1X PBS. 40 µm thick sections were obtained with a vibratome (VT1000S, Leica). Free floating sections were washed in PBST (0,1% tween-20 in 1X PBS) and incubated at 37 °C for 30 minutes in 2N HCl to retrieve antigen in the case of BrdU or PCNA labelling. Incubation with primary antibody was carried out overnight at 4°C in blocking buffer (10 % NGS, 1% DMSO, 0,3% Triton-X100 in 1X PBS). The following antisera were used in this study: rabbit anti-aPKCζ (1:200; C-20, sc-216, Santa Cruz Biotechnology), chicken anti-GFP (1:1000; Aves), mouse anti-GS (1:500; MAB302, Millipore), mouse anti-HuC/D (1:500; clone 16A11, Invitrogen), mouse anti-PCNA (1:1000; PC10, DAKO), rabbit anti-sox2 (1:1000; ab97957, Abcam), rat anti-BrdU (1:500; ab6326, Abcam) and rabbit anti-DsRed (1:300; 632496, Clontech).

Primary antibodies were detected with appropriate secondary antibodies coupled to Alexa-Fluor 488, Alexa-Fluor 568, Alexa-Fluor 594 and Alexa-Fluor 647 (1:200; Molecular Probes). Sections were mounted in Vectashield Hard Set™ (Vector) mounting medium for observation of fluorescence.

TUNEL assay

We used the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (G3250, Promega) and followed a protocol provided by Lihong Zhan (https://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwim9pjG49HWAhVGthoKHXI3D_UQFggpMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D57e1dc12217e205fd33cc9d6%26a_ssetKey%3DAS%253A408560115699712%25401474419730463&usg=AOvVaw3iioU1nlWVEKUuD76cRg0) which was adapted from Deng et al., 2001. In brief, free floating 40µm thick brain slices were dried at 55 °C for 5 minutes on glass slides. They were then permeabilized in 0.5% Triton X-100 in 1X PBS at 85°C for 20 minutes and washed in 1X PBS. Equilibration and labeling were performed according to the manufacturer's instructions.

Whole-mount *in situ* hybridization

Riboprobes were synthesized as follow: cDNA (PCR amplified with specific primers, see Table1) was inserted into a pCR II-TOPO vector (Molecular probes). Sequences and orientation of the inserts were checked by direct sequencing (GATC Biotech). The products of PCR

amplification of the inserts with generic SP6-T7 primers were used to synthesize the antisense riboprobes, with the T7 or SP6 polymerase (Promega) (chosen on the basis of the sequencing results). Digoxigenin (DIG)-conjugated probes were synthesized with the UTP-DIG nucleotide mix (Roche) and then purified with the RNA clean up kit (Macherey Nagel). Primers used to synthesize DIG riboprobes are indicated in Table 2.

Whole-mount *in situ* hybridization was performed on manually staged (according to Kimmel et al., 1995) dechorionated embryos and larvae fixed in 4% formaldehyde in 1X PBS and stored in methanol at -20°C. Briefly, methanol stored specimens were rehydrated in a methanol/PBS series, permeabilized with proteinase K (10 mg/ml), pre-hybridized, and then hybridized overnight at 65°C in hybridization mixture (HM: 50% formamide, 5X standard saline citrate (SSC), 0.1% Tween 20, 100 mg/ml heparin, 100 mg/ml tRNA in water). After a series of washes in 50% SSC/formamide and SSC/PBST, embryos were incubated in blocking solution (0.2% Tween 20, 0.2% Triton X-100, 2% sheep serum in PBST) and incubated overnight at 4°C with AP-conjugated anti-DIG antibodies (Roche) diluted 1:4000 in blocking solution. Embryos were then washed in PBST, soaked in staining buffer (TMN: 100mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 0.1% Tween 20 in water) and then incubated in NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) solution (Roche). Juvenile brains were dissected out and processed as previously described but with 1h of proteinase K treatment (10 mg/ml). Antisense riboprobes were diluted in a hybridization buffer containing 5% dextran. For histological analysis, 30-µm thick agarose sections were prepared using vibratome.

| Gene | Gene ID | Primers |
|-------------------|--------------------|---|
| <i>fam98b</i> | ENSDARG00000060068 | Primer fwd ACACACACACAGGACGAGAT Primer Rev TGCCTCCTCCTCCATCAGA |
| <i>spred1</i> | ENSDARG00000041449 | Primer fwd CTTCCGCTGCTCATAACACAC Primer Rev ATCCTGCAGCCTTGTGTTTG |
| <i>meis2a</i> | ENSDARG00000098240 | Primer fwd TCGCTGCGCTTTTACAACCTT Primer Rev TGCCTCGTTGAAGGAGTCC |
| <i>zgc:154061</i> | ENSDARG00000070461 | Primer fwd ACTGGTTCGGCTTCATCTCA Primer Rev TGGGAAGGGTTAAGAGTGGG |
| <i>dph6</i> | ENSDARG00000042839 | Primer fwd ACGGTGAACATCATGAGGGT Primer Rev GGTCTCTGTGGCGTCTATGA |

Table 2. Primers used to synthesize DIG riboprobes.

Image acquisition and processing

Images of whole embryos were taken with a Nikon AZ100M zoom microscope. Paraffin sections were photographed with a Leica DMRD microscope. Images of fluorescent brains were acquired with a Leica TCS SP8 confocal microscope (Airy: 1; Objectif Plan-APOCHROMAT 40x/1.10 WATER). Brightness and contrast was adjusted using ImageJ software.

Data quantification and statistical analysis

A minimum of three animals were analysed per experimental conditions. Cell counts were done manually on every section where the lesion was visible (basically around ten 40 μ M thick sections per brain). Comparison between the groups was made by Mann & Whitley test using XLSTAT. Data are presented as mean \pm SD. Statistical significance was set at $p < 0,05$.

RESULTS

OT can partially restore tissue architecture after a mechanical injury.

To study the regenerative potential of OT, we performed stab lesions using a needle. We reproducibly poked the left hemisphere dorso-ventrally without disrupting ventricle integrity (**Figure 1A**). This procedure did not produce any noticeable change in the injured fish behaviour. Wound healing of bone and skin was complete within days (data not shown). In adults, OT is composed of layers of cell bodies in the periventricular grey zone (PGZ), which is covered by the neuropil, a fibrous zone mainly composed of axons and dendrites of PGZ cells. Hence, because most of the lesions were performed in the fibrous zone of the tectum, we expected most if not all cells at the location or below the injury to be strongly affected. Cresyl violet staining at 1 dpl indeed revealed many pycnotic foci and acellular holes in the PGZ located below the lesion site, suggesting severe perturbations of all OT layers (**Figure 1B**). In contrast, because the poke was localized in the centre of the OT hemisphere, peripheral proliferation zones were not affected.

We followed kinetics of cell death by quantifying the number of TUNEL positive cells four hours post-lesion (hpl), as well as one day and three days post-lesion (dpl). TUNEL⁺ cells were detected as soon as 4 hpl on the lesioned hemisphere whereas none are observed on the control hemisphere (**Figure 1C**). Numerous TUNEL⁺ cells were observed both in the neuropil and the peripheral grey zone (PGZ) in the vicinity of the lesion at 1dpl. At 3 dpl, although the number

of TUNEL⁺ cells was significantly lower than at 1 dpl, it was still superior to the numbers observed in controls (**Figure 1D**).

We analyzed cross sections from injured fish at 3 dpl, and 1, 3 and 12 months post lesions (mpl). Tissue breakdown was obvious at 3 dpl and exhibited pycnotic nuclei and acellular holes in a similar fashion than at 1 dpl (**Figure 1E**). Examination of OT few months after injury unveiled progressive improvement of neuropil aspect which was homogeneous and whose external border appeared smoothed. Conversely, we did not see any marked change in the PGZ morphology which still displayed sparse nuclei at the site of injury 12 mpl (**Figure 1E**). One striking feature of the lesioned hemisphere was the presence of a connection between the OT and the torus semicircularis which we observed in the majority of the brains from 1mpl to 12 mpl (66%, n=9 brains) (**Figure 1E**). Our results pointed to a failure of the OT to reconstruct a normal layered organisation following a localised mechanical injury.

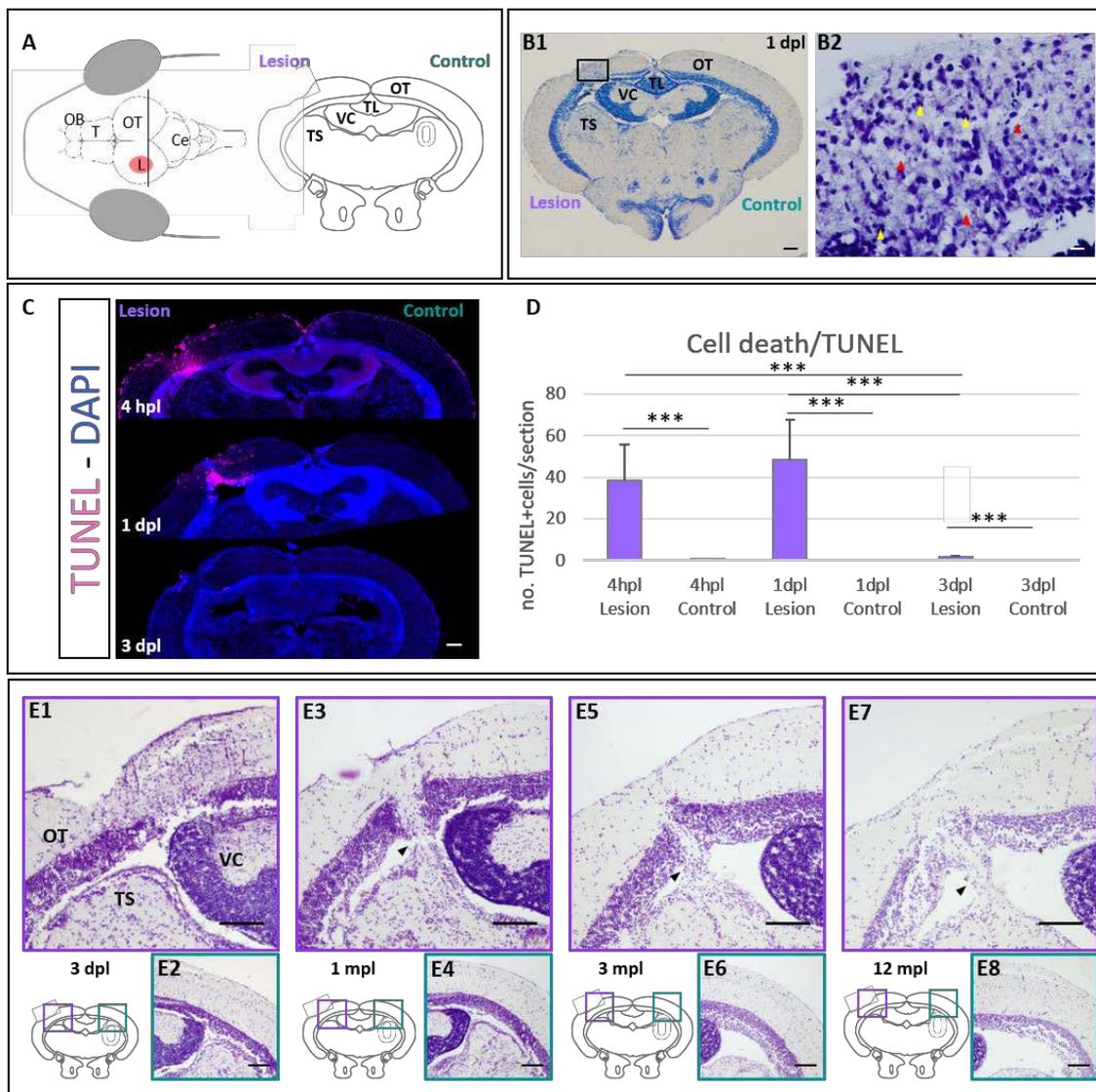


Figure 1. Partial recovery of the OT following a stab lesion

(A) Overview of the injury model.

(B) Transverse section of a brain stained with cresyl violet showing the lesion one day after injury (B1). (B2) Higher magnification of the site of injury (black rectangle in B1). Acellular holes (red arrowheads) and piknotic nuclei (yellow arrowheads) were prominent in this region.

(C) Transverse sections of injured brains stained with TUNEL at the time indicated.

(D) Quantification of TUNEL⁺ cells at 4 hpl (n=5), 1 dpl (n=4) and 3 dpl (n=4). Data are mean ± SD. ***P≤0.001.

(E) Transverse section of brains stained with cresyl violet at 3 dpl (E1-E2), 1 mpl (E3-E4), 3 mpl (E5-E6) and 12 mpl (E7-E8). The lesion was visible at all stages examined (E1, E3, E5, E7) when compared to the control hemisphere (E2, E4, E6, E8). A bridge linking the OT to the TS was often present (black arrowhead).

Scale bars : 100 µm in B1, C, E1-E8; 20 µm in B2. Abbreviations : Ce, cerebellum; dpl, day(s) post-lesion; hpl, hour(s) post-lesion; mpl, month(s) post-lesion; OB, olfactory bulb; OT, optic tectum; T, telencephalon; TL, torus longitudinalis; TS, torus semicircularis; VC, valvula cerebelli.

Injury of the OT activates cells at the site of lesion and at the region of constitutive cell proliferation

It was previously reported in other zebrafish brain regions that such injury-induced progenitor recruitment begins around 3 dpl and is maintained for a few days (Kroehne et al., 2011; Kishimoto et al., 2012). At 3 dpl, we observed a population of PCNA immunoreactive cells lining the ventricle under the site of injury. In contrast, no PCNA⁺ cells were found in the same location on the contralateral control hemisphere (**Figure 2A**). Additionally, we carried out an EdU incorporation assay as a readout of cell proliferation response. The number of EdU⁺ nuclei was observed on the injured side at 3 dpl, while no cells was detected in homeostatic conditions (n=4 brains). Later, at 33 dpl, EdU⁺ nuclei were no longer detected on the injured side (n=3 brains) (**Figure 2B**). This confirmed that ventricular reactive cells were present at the site of injury and that the proliferation response was of limited duration.

Interestingly, cell counts at the site of constitutive cell proliferation at the periphery of the OT revealed that EdU⁺ nuclei are two times more numerous on the injured side (n=4 brains) (**Figure 2C**). This indicates despite they are distant from the injury site, peripheral progenitors react to the injury.

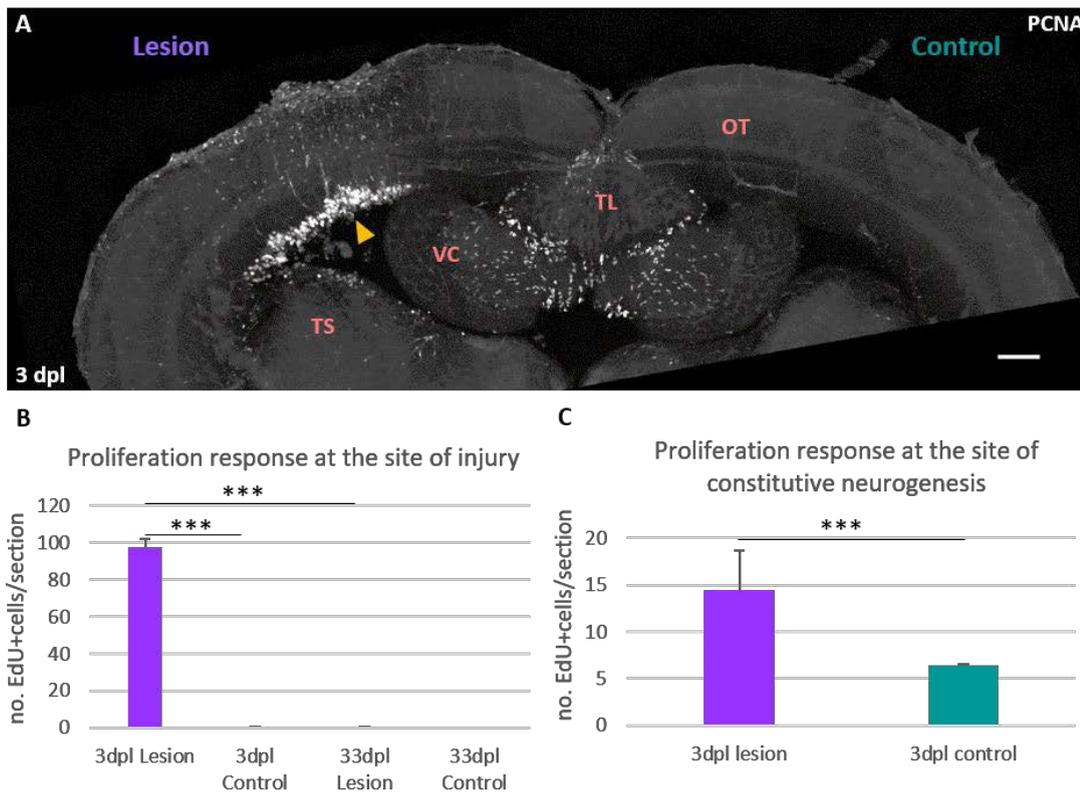


Figure 2. Reactive cell proliferation after OT injury

(A) Transverse section of a brain at 3 dpl immunolabeled for the cell proliferation marker PCNA. Yellow arrowhead indicates reactive cells at the ventricle of the injured hemisphere.

(B) Quantification of EdU⁺ cells at the site of injury at 3 dpl (n=4) and 33 dpl (n=3).

(C) Quantification of EdU⁺ cells at the site of constitutive cell proliferation at 3 dpl (n=4).

Data are mean \pm SD. ***P \leq 0.001. Scale bar : 100 μ m. Abbreviations : dpl, day(s) post-lesion; OT, optic tectum; TL, torus longitudinalis; TS, torus semicircularis; VC, valvula cerebelli.

Her4 endependymogial cells are activated upon injury

To characterise which types of cells are in proliferation in the ventricular region after the lesion, we performed two independent immunohistochemistry experiments.

In the first one, fish at 3dpl were intraperitoneally injected with EdU to label the recruited cells and killed four hours later. We observed that almost all EdU⁺ cells were immunoreactive for GS, a radial glia marker (n=4 brains) (**Figure 3A**). To confirm these results, we studied GFP positive cells in a *Tg(gfap:GFP)* transgenic line. These results showed that in the ventricular region all PCNA positive cells were co-labelled with GFP (n=3 brains) (**Figure 3B**). Together, these results suggest that OT ventricular proliferating cells are radial glia. Previous studies in

the adult zebrafish OT showed that RG cells also express *her4* (Galant et al., 2016). For this reason, to trace their fate during regeneration, we used the *Tg(her4:ERT2CreERT2)* driver line expressing the tamoxifen-inducible Cre recombinase (CreER) in *her4* positive RG cells (Boniface et al., 2009). Fish carrying the *her4:ERT2CreERT2* allele were crossed with *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}* ubiquitous Cre-responder line (Wang et al., 2011) in which mCherry is only expressed upon Cre-mediated recombination (**Figure 3C**). We performed recombination just before the mechanical lesion. In the injured hemisphere, the number of mCherry⁺ cells was significantly higher than in the control OT hemisphere, thus indicating an amplification of recombined *her4* glial cells (n=3 brains) (**Figure 3D**). Moreover, at the site of injury, some mCherry⁺ cells were not lining the ventricle but were located in subventricular layers of the PGZ suggesting that the progeny of *her4* recombined cells could differentiate into neurons (**Figure 3E**).

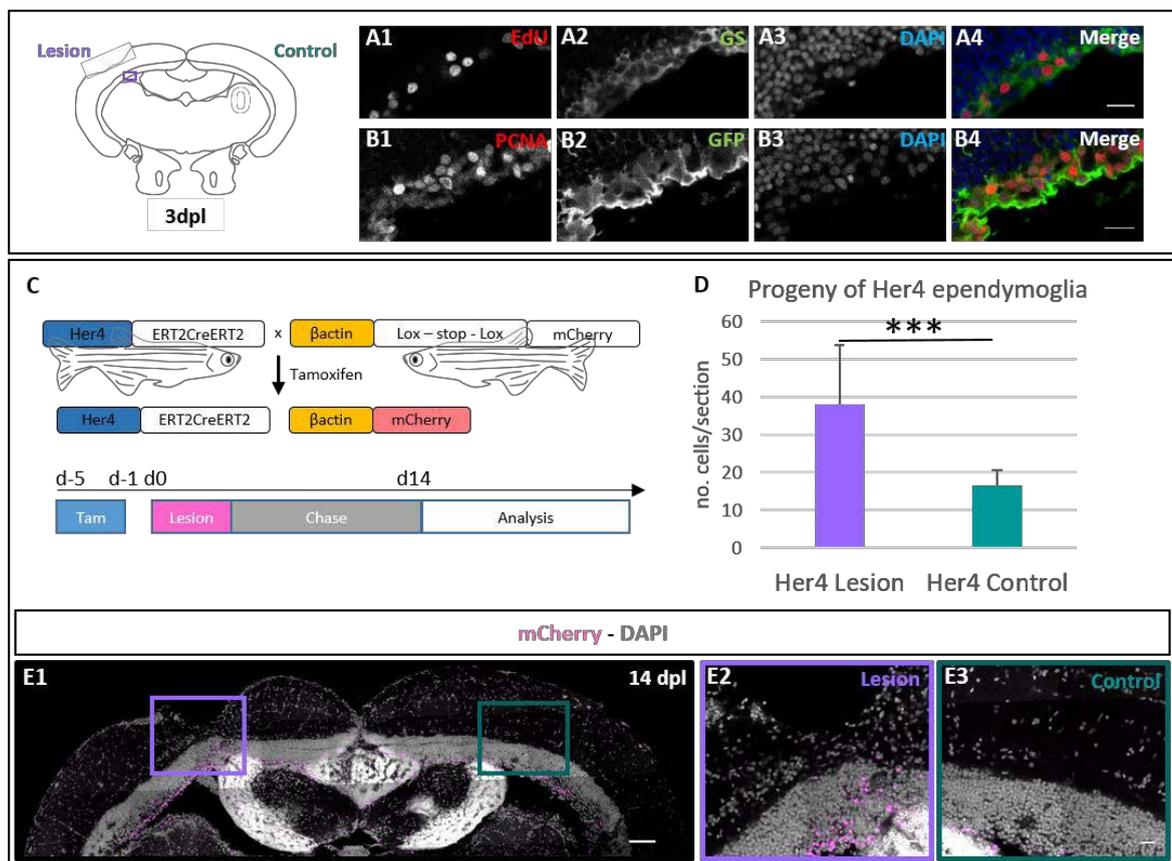


Figure 3. Activation of OT ependymglial cells at the site of injury

(A) High magnification of a transverse section of the OT ventricular zone at the site of injury at 3 dpl (schematized by the purple rectangle on the left panel). Many GS⁺ ependymglial cells were colabeled with EdU.

(B) High magnification of a transverse section of the OT ventricular zone at the site of injury at 3 dpl in *Tg(gfap:GFP)* (schematized by the purple rectangle on the left panel). GFP⁺ ependymogial cells were immunopositive for PCNA.

(C) Generation of double-transgenic fish used for cell fate analysis. Fish expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the *her4* promoter (*Tg(her4:ERT2CreERT2)*) were crossed to *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}*. mCherry expression can be specifically induced in *her4*-expressing ependymogial cells and their progeny by tamoxifen application. Tamoxifen was applied for 4 days and the injury performed one day after tamoxifen removal. Fish were analysed 14 days later.

(D) Quantification of mCherry⁺ cell number in the injured vs control hemisphere from fish produced as explained in (C) (n=3). Data are mean ± SD. ***P≤0.001.

(E) Transverse section of a brain from fish produced as explained in (C). High magnifications of the injured (E2) and control (E3) sides highlighted a higher progeny in the injured hemisphere.

Scale bars : 20µm in A, B, E2, E3; 100 µm in E1. Abbreviations : dpl, day(s) post-lesion.

A *Meis2a* enhancer labels peripheral constitutive progenitors of the OT

Our results showed that the constitutive NE progenitors at the marginal zone over proliferate following injury. To follow the fate of these newborn cells we decided to use similar lineage tracing experiments to those used for glial cells. The only known driver for OT NE progenitors is *her5*. Unfortunately, *her5* expression is weak in the adult. *Tg(her5:Cre2ERT2)*-driven recombination was reported to be inefficient at stages later than 5dpf (Galant et al., 2016). To search for a strong driver to follow the fate of NE progenitors after injury, we datamined the Vista Enhancer Browser (Visel et al., 2007) for functionally validated enhancers in mice with a strong and specific embryonic expression in the superior colliculus, a mammalian brain region homologous to the teleostean OT. We identified one enhancer upstream of the gene coding for the TALE-homeodomain protein *Meis2*, which is necessary and sufficient for a tectal fate during development (Agoston and Schulte, 2009). Interestingly, this element (named Hs830 and Mm830 in mouse) is ultraconserved. A homologous element was also located upstream of *meis2a* in the zebrafish genome. *In situ* hybridizations revealed that zebrafish *meis2a* was expressed in OT NE at larval and adult stages (**Figure 4**).

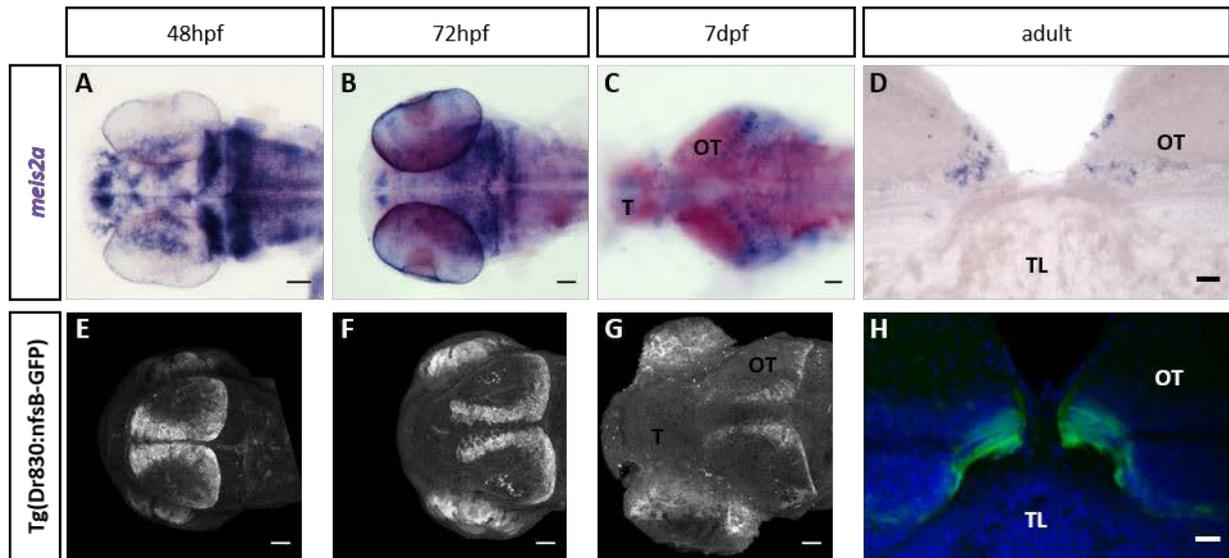


Figure 4. Dr830 element is an enhancer of *meis2a*

(A-D) *meis2a* *in situ* hybridization in whole heads (dorsal view, anterior left) at 48 hpf (A) and 72 hpf (B), in a whole dissected brain at 7 dpf (C) and at the OT margin on transverse section in adult fish (D).

(E-H) GFP expression in *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* in whole heads (dorsal view, anterior left) at 48 hpf (E), 72 hpf (F), and 7 dpf (G) and at the OT margin on transverse section in adult fish (H).

Scale bars : 20 μ m in A-D, H; 30 μ m in E-G. Abbreviations : OT, optic tectum; T, telencephalon; TL, torus longitudinalis.

These results prompted us to establish a reporter line named *Tg(Dr830:nfsB-GFP)*. In this line, GFP started to be visible in all the midbrain primary vesicle at 24 hpf (data not shown) and was progressively restricted to OT margins at stages when proliferation became restricted to the periphery. In adults, GFP immunolabeled cells from *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* brains were conspicuous at the OT dorsal margins and in the PML (**Figure 4**). Such OT expression was reminiscent of the *meis2a* endogenous expression, except for the PML where *meis2a* is not expressed (data not shown). The Hs830 regulatory element is located in a syntenic region which encompasses four other genes in addition to *Meis2* (*Spred1*, *Dph6*, *Fam98b*, *Zgc:154061*). We performed ISH at 48hpf and 72 hpf but none of them showed expression in the OT (**Figure 5**).

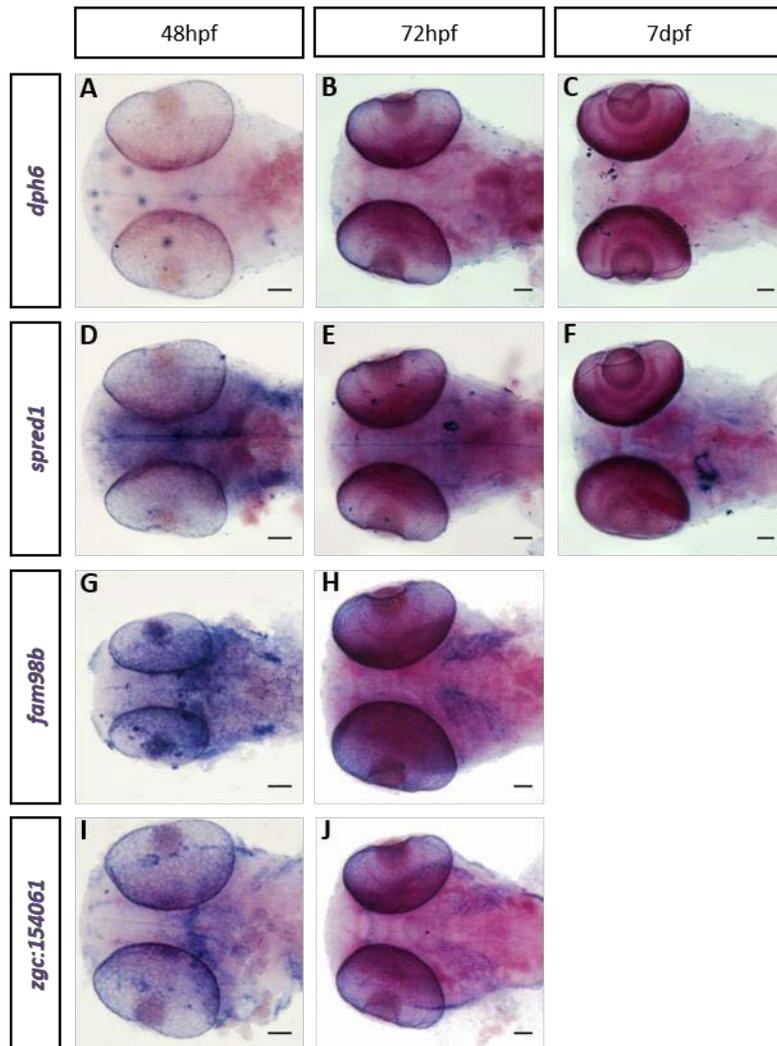


Figure 5. Other putative Dr830 controlled genes are not expressed in the OT.

(A-C) *dph6* *in situ* hybridization in whole heads (dorsal view, anterior left) at 48 hpf (A), 72 hpf (B), and 7 dpf (C).

(D-F) *spread1* *in situ* hybridization in whole heads (dorsal view, anterior left) at 48 hpf (A), 72 hpf (B), and 7 dpf (C).

(G-H) *fam98b* *in situ* hybridization in whole heads (dorsal view, anterior left) at 48 hpf (A) and 72 hpf (B).

(I-J) *zgc: 154061* *in situ* hybridization in whole heads (dorsal view, anterior left) at 48 hpf (A) and 72 hpf (B).

Scale bars : 20 μ m.

Considering these results, it seemed likely that the Dr830 element is a *meis2a* enhancer. Further characterization by immunohistochemistry of GFP-positive cells present at OT margins indicated that they are also positive for the cell polarity marker aPKC (**Figure 6B**) and the neural progenitor marker Sox2 (**Figure 6C**), but negative for GS (**Figure 6C**).

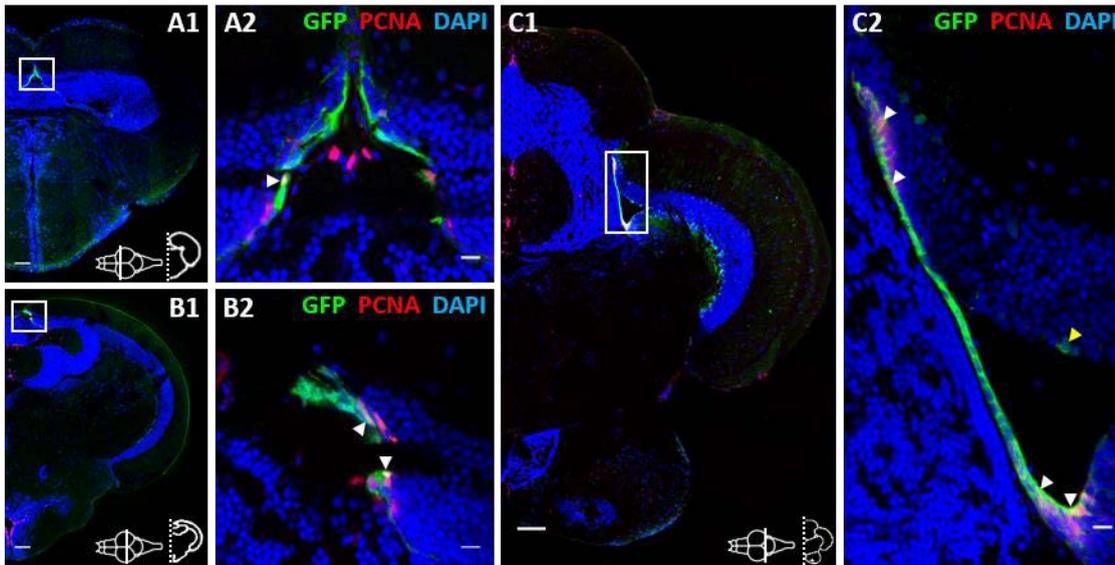


Figure 6. Dr830 targeted cells exhibit molecular features of neuroepithelial cells in adult

(A-C) Molecular characterization of GFP⁺ cells at the margin of the OT (red square in A) in transverse section of adult *Tg(Dr830:nfsB-GFP)*.

(B) Comparison of the expression of the GFP (B1) with that of the cell polarity marker aPKC (B2). GFP expressing cells are delineated with dashed lines. They are aPKC⁺ at their apical side. DAPI is used as a nuclear counterstaining (B3).

(C) Comparison of the expression of the GFP (C1) with that of the progenitor marker SOX2 (C2) and glial marker GS (C3). GFP expressing cells are delineated with dashed lines. Most GFP⁺ cells expressed SOX2 but not GS. DAPI is used as a nuclear counterstaining (C4).

Scale bars : 10 μm.

Moreover, 21% of GFP⁺ cells are co-labeled with PCNA (n=3brains) (**Figure 7**). We also noticed that many RG cells (i.e. lining the ventricle and GS⁺) in the OT expressed GFP but at a much weaker levels (**Figure 7C**). Thus we concluded that in the *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* transgenic line, a strong GFP-positive expression was found in OT NE progenitors, previously reported to be constitutive progenitors (Alunni et al., 2010; Ito et al., 2010; Galant et al., 2016).

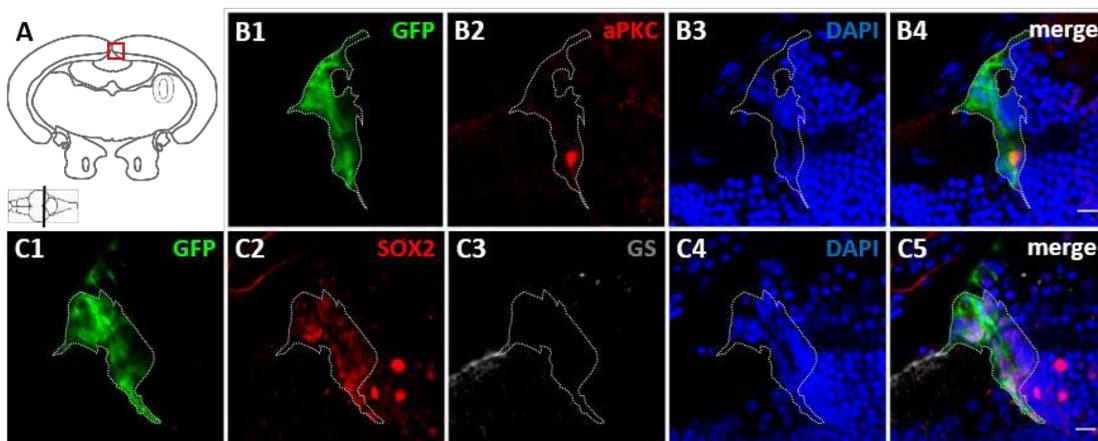


Figure 7. Dr830 element labels OT adult progenitors

(A-C) Compared expression GFP⁺ cells with PCNA-positive proliferating cells on transverse section from adult *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* brain. Double-positive cells (white arrowheads) were found at the dorsal margin of the OT all along its rostro-caudal axis. DAPI is used as a counterstaining.

(A) Anterior section level. High magnification (A2) corresponds to the white square in A1.

(B) Intermediate section level. High magnification (B2) corresponds to the white square in B1.

(C) Intermediate section level. High magnification (C2) corresponds to the white rectangle in C1. The GFP⁺ fold linking the OT dorsally to the torus semicircularis ventrally corresponds to the PML. Double-positive cells were also found at the tip of the torus semicircularis. At this section level, many ependymogial cells expressed GFP (C1, yellow arrowhead in C2) although at weaker levels.

Scale bars : 100 μ m in A1, B1, C1; 10 μ m in A2, B2, C2.

Meis2a enhancer allows cell lineage tracing of OT constitutive progenitors

To perform temporal tracing of constitutive progenitors of the OT, we established a tamoxifen-inducible Cre recombinase (ERT2CreERT2) expressing line under the transcriptional control of the Dr830 enhancer. *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* allowed to perform cell lineage experiments when crossed with the ubiquitous floxed reporter line *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{hh15}*. We achieved tamoxifen treatments at 2 dpf, 7 dpf and 2 mpf, the outcome of which were analyzed at 3 mpf after 4 days of BrdU pulse. When recombination was induced at 2 dpf, we found mCherry positive progeny in the entire OT and torus semi-circularis (100% of the cases, n=3 fish analysed) (**Figure 8**).

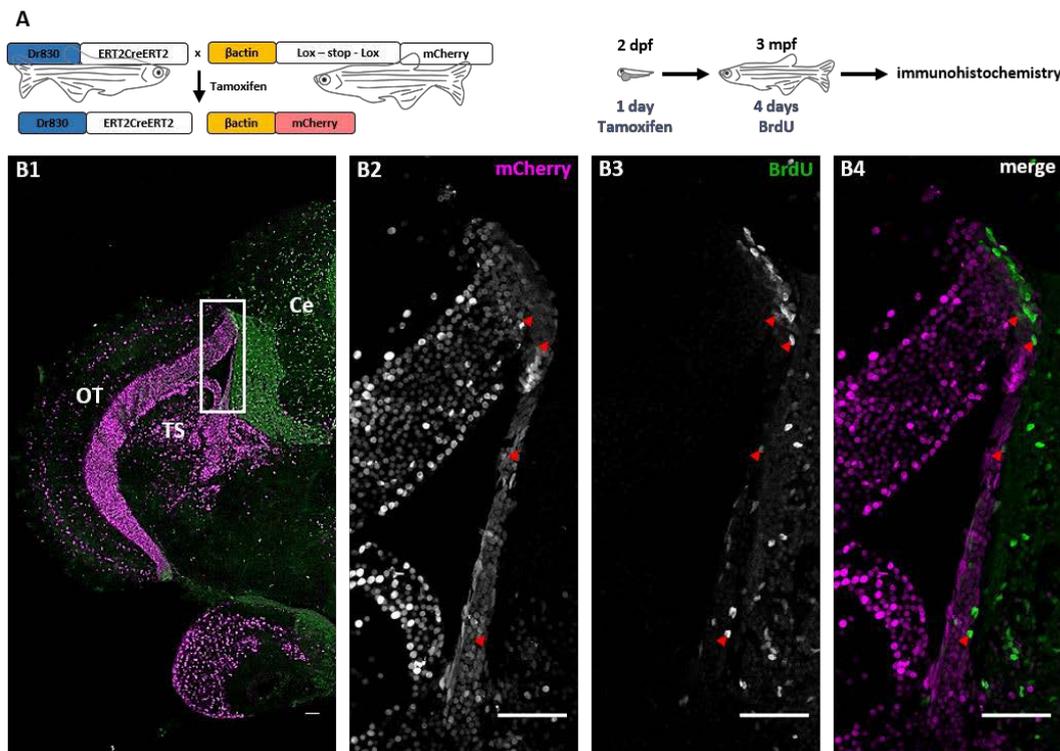


Figure 8. Embryonic Dr830 progenitors are at the origin of OT development

(A) Generation of double-transgenic fish used for cell fate analysis. Fish expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the Dr830 (*Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*) were crossed to *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{h15}*. mCherry expression can be specifically induced in Dr830 targeted progenitors and their progeny by tamoxifen application. Tamoxifen was applied for 1 days on 2 dpf embryos. Adult fish were analysed at 3 mpf after a four days BrdU treatment to label cycling cells.

(B) Transverse section of a brain from fish produced as explained in (A). mCherry⁺ cells comprised most if not all OT and torus semicircularis cells (B1). Higher magnification of the PML (white rectangle in B1) allowed to emphasize BrdU/mCherry double-positive cells (red arrowheads in B2-B4) suggesting that some adult progenitors derived from embryonic Dr830 progenitors.

Scale bars : 20 µm. Abbreviations : Ce, cerebellum; OT, optic tectum; TS, torus semicircularis.

This suggested that Dr830 enhancer targeted the dorsal midbrain stem cell region. When applied between 7 and 9 dpf, recombination yielded mCherry⁺ polyclones in virtually all the OT (100% of the cases, n=3 fish analysed) and torus-semicircularis (**Figure 9**).

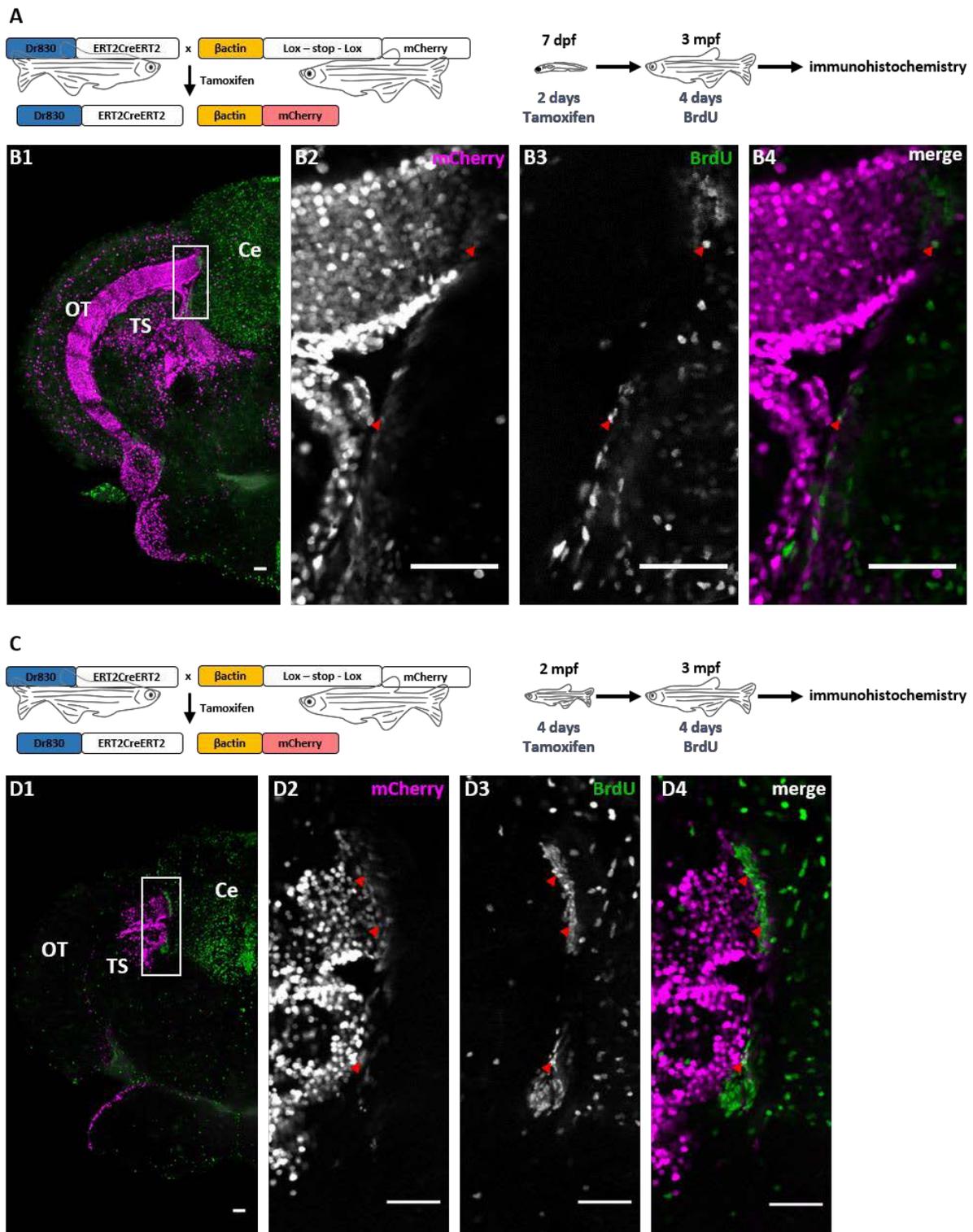


Figure 9. Postembryonic Dr830 progenitors sustain OT neurogenesis and are self-renewing

(A) Fish expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the Dr830 (*Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*) were crossed to *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}*. mCherry expression can be specifically induced in Dr830 targeted progenitors and their progeny by tamoxifen application. Tamoxifen was applied for 2 days on 7 dpf larvae. Adult fish were analysed at 3 mpf after a four days BrdU treatment to label cycling cells.

(B) Transverse section of a brain from fish produced as explained in (A). mCherry⁺ cells comprised most OT and torus semicircularis cells (B1). Higher magnification of the PML (white rectangle in B1) allowed to emphasize BrdU/mCherry double-positive cells (red arrowheads in B2-B4) suggesting that some adult progenitors derived from larval Dr830 progenitors.

(C) Fish expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the Dr830 (*Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*) were crossed to *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}*. mCherry expression can be specifically induced in Dr830 targeted progenitors and their progeny by tamoxifen application. Tamoxifen was applied for 4 days on 2 mpf juveniles. Adult fish were analysed at 3 mpf after a four days BrdU treatment to label cycling cells.

(D) Transverse section of a brain from fish produced as explained in (C). mCherry⁺ cells were found close to the OT dorsal margin as well as at the tip of torus semicircularis (D1). Higher magnification of the PML (white rectangle in B1) allowed to emphasize BrdU/mCherry double-positive cells (red arrowheads in D2-D4) suggesting that some adult progenitors derived from juveniles Dr830 progenitors.

Scale bars : 20 µm. Abbreviations : Ce, cerebellum; OT, optic tectum; TS, torus semicircularis.

Noticeably, several peripheral NE cells remained positive for mCherry. Importantly, we detected mCherry/BrdU double positive cells suggesting that part of the OT adult progenitor population originated from recombined Dr830 cells (100% of the cases, n=1 fish analysed) (**Figure 9B**). These data demonstrated a long term maintenance of the progenitor pool at the population level.

After recombination at juvenile stage (2 mpf), mCherry⁺ cells were observed in the OT (100% of the cases, n=2 fish analysed) at a short distance from OT margins and from the torus-semicircularis (**Figure 9C**). This suggested that mCherry⁺ cells were born from progenitors located in the TPZ or in the PML. Some putative clones were organized in columns which would indicate that recombined mother cells was positioned upstream in the clonal hierarchy (**Figure 10**). While the relative number of mCherry⁺ cells was lower than after earlier recombinations, some of them were BrdU-positive confirming self-renewal of this cell population.

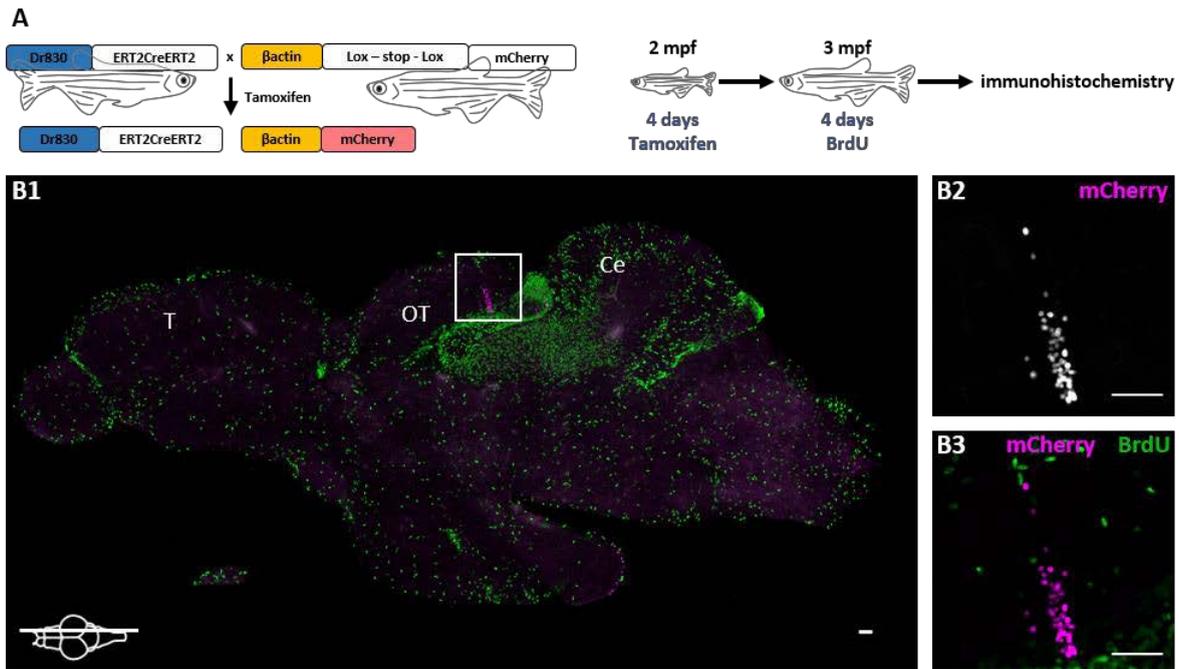


Figure 10. Some Dr830 progenitors are upstream in the hierarchy that build OT clonal units

(A) Fish expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the Dr830 (*Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*) were crossed to *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}*. mCherry expression can be specifically induced in Dr830 targeted progenitors and their progeny by tamoxifen application. Tamoxifen was applied for 4 days on 2 mpf juveniles. Adult fish were analysed at 3 mpf after a four days BrdU treatment to label cycling cells.

(B) Sagittal section of a brain from fish produced as explained in (A). One column of mCherry⁺ cells likely originating from one single clone was observed (B1, and higher magnification in B2-B3).

Scale bars : 20 μm. Abbreviations : Ce, cerebellum; OT, optic tectum; T, telencephalon.

Overall, our results showed that the cell population marked by the Dr830 enhancer housed at least some OT constitutive progenitors and was self-renewing at all stages under scrutiny.

Dr830 is an injury response element

Before using *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* in a regenerative context, we controlled the behavior of the Dr830 enhancer following a lesion at 3dpl. Consistently with previous data showing activation of constitutive progenitors, we quantified a higher number of Dr830⁺/EdU⁺ cells on the injured side of *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* (**Figure 11A and B**). Unexpectedly, the ventricular region at the site of injury exhibited a stronger GFP expression level than the control side (**Figure 11C**). Hence, Dr830 regulatory sequence responds to injury. This element was possibly over-activated in the reactive ependymogial cells. This would prevent the specific tracing of constitutive peripheral progenitors during regeneration. To avoid this drawback, we performed

tamoxifen treatments before injury to avoid unwanted recombination events in ependymogial cells.

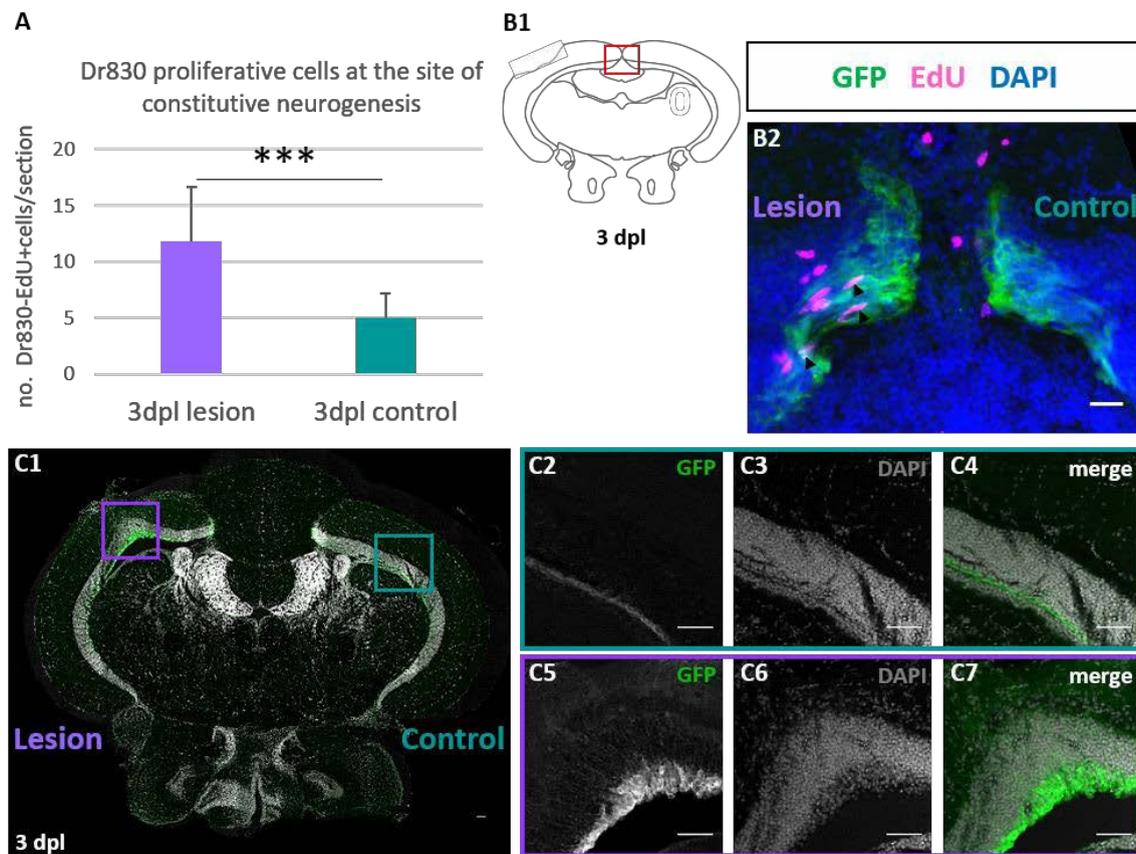


Figure 11. Dr830 element reacts to the injury

(A) Quantification of GFP/EdU double-positive cells at 3 dpl (n=4). Data are mean \pm SD. *** $P \leq 0.001$.

(B) Transverse section of an EdU labeled brain from *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* at 3 dpl. B2 is a magnification of the region delineated by the red square in on the scheme in B1. DAPI is used as counterstaining. GFP⁺ cells colabeled with EdU are indicated (black arrowheads).

(C) Transverse section of a brain from *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* at 3 dpl. GFP expression at the ventricle is stronger at the site of injury (purple square in C1, magnified in C5-C7) than on the control hemisphere (blue-green square in C1, magnified in C2-C4). DAPI is used as counterstaining.

Scale bars : 20 μ m. Abbreviations : dpl, days post-lesion.

Fate of OT constitutive progenitors after injury

Having determined experimental conditions to trace the progeny of OT constitutive progenitors in regenerative conditions, we closely examined polyclones repartition following injury in tamoxifen-treated *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*. We recombined adult fish during four days and performed the lesion one day after. We analyzed Dr830 cell progeny at 28 dpl (Figure 12A).

Dr830 progenitors gave rise to a higher number of cells in the injured hemisphere (Figure 12B). This is in agreement with activation of constitutive progenitors. More surprising was the presence of mCherry⁺ cells at the site of injury. Indeed, in contrast to the majority of mCherry⁺ cells, which were close to the OT margin, these cells were far from their putative mother cells.

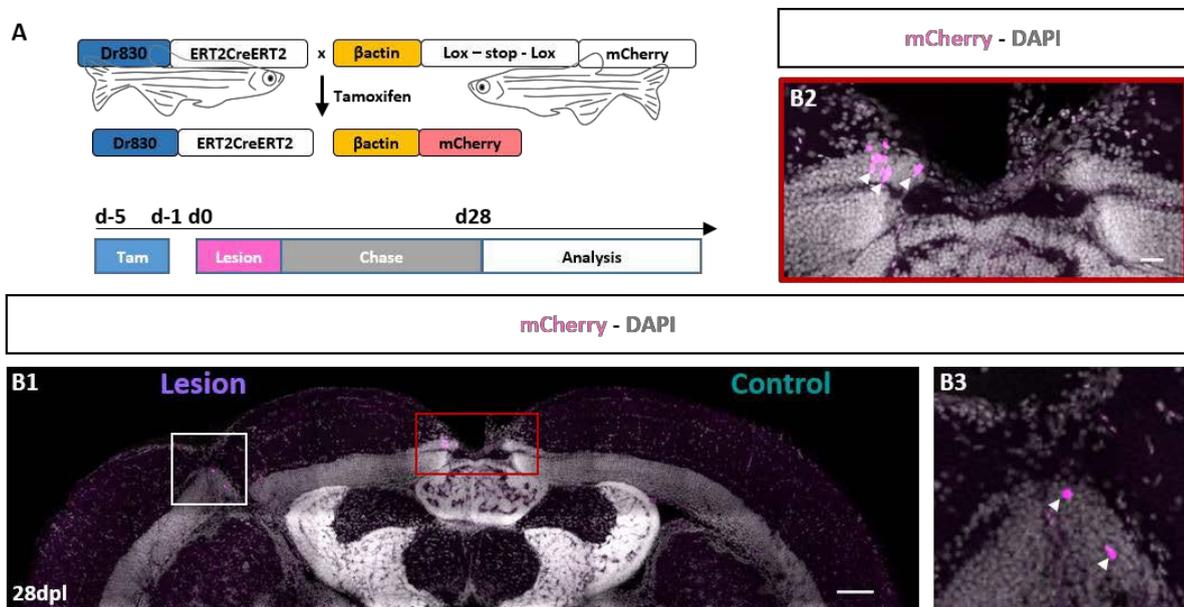


Figure 12. Activation of OT constitutive progenitors after injury

(A) Generation of double-transgenic fish used for cell fate analysis. Fish expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase controlled by the Dr830 enhancer (*Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*) were crossed to *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}*. mCherry expression can be specifically induced in Dr830 cells and their progeny by tamoxifen application. Tamoxifen was applied for 4 days and the injury performed one day after tamoxifen removal. Fish were analysed 28 days later.

(B) Transverse section of a brain from fish produced as explained in (A). mCherry⁺ cells (white arrowheads) were more frequently observed on the injured hemisphere. The majority were found close to OT dorsal margin (red rectangle in B1, magnified in B2) but few scattered cells are also present at the site of lesion (white square in B1, magnified in B3). DAPI is used as a counterstaining.

Scale bars : 20 μ m.

To date, we could only obtain preliminary data regarding the contribution of either constitutive or latent progenitors in OT neuronal regeneration. More results are needed before submitting this manuscript. For this reason, I did not write a specific discussion here. All the validated and ongoing results will be discussed in the “discussion general” at the end of my PhD manuscript.

II- Données complémentaires

1. Expériences en cours

A ce jour, nous n'avons pas encore montré qu'il y avait une régénération neuronale dans le TO de poisson zèbre adulte à la suite d'une lésion. Des expériences sont actuellement en cours pour compléter le travail décrit dans la publication.

La première d'entre elles est de montrer que de nouveaux neurones sont générés à la suite d'une lésion. Pour cela, j'ai réalisé une lésion mécanique sur des poissons zèbres adultes comme décrite dans le manuscrit en préparation. Les poissons blessés ont été incubés dans des bains de BrdU de 3 à 5 dpl afin de marquer les cellules en prolifération au moment du pic de prolifération induit par la lésion. Les poissons ont été tués à 21 et 90 dpl, leurs cerveaux disséqués et conservés en méthanol à -20°C. Il faut finaliser l'expérience par des immunomarquages anti-BrdU et anti-HuC/D. Les cellules doublement marquées au niveau du site de lésion seront des neurones générés à la suite de la lésion cérébrale.

La seconde expérience consiste à déterminer quelle est la contribution des cellules Her4 et des cellules Dr830 dans le processus de régénération du TO. Pour cela, des poissons *Tg(her4:ERT2CreERT2)* et *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* ont été croisés avec des poissons *Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)^{jh15}* (**figure 35**).

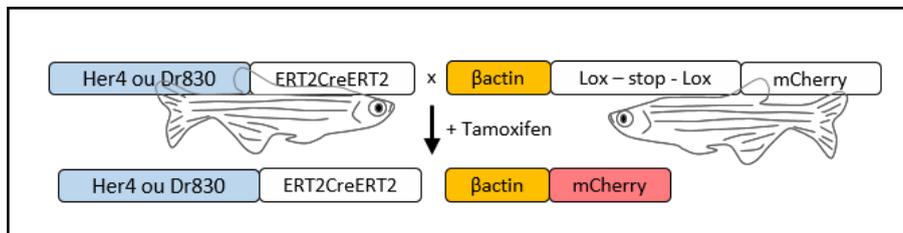


Figure 35 : Génération de poissons double transgéniques pour analyse du lignage cellulaire à la suite d'une lésion.

Dans les poissons adultes doubles transgéniques, l'expression de la mCherry est induite spécifiquement dans les cellules gliales Her4 ou dans les cellules neuroépithéliales Dr830 ainsi que dans leurs descendantes respectives après recombinaison induite par le tamoxifène. A la fin du traitement au tamoxifène, j'ai réalisé une lésion mécanique sur l'un des deux lobes du TO de chaque poisson. A ce jour, les poissons sont en croissance dans l'animalerie et seront étudiés à 1 et 2 mois après la lésion. Je dois finaliser l'expérience par des immunomarques anti-mCherry et anti-Huc/D. Les cellules doublement marquées seront des neurones qui ont été générés par des progéniteurs neuroépithéliaux constitutifs du TO et/ou issus de cellules Her4 donc de progéniteurs latents.

2. Caractérisation d'un pont entre toit optique et torus semicircularis

Dans l'article, sur coupes histologiques de cerveaux blessés par lésion mécanique, j'ai mentionné qu'une extension se forme entre le TO et le torus semicircularis de 1 mpl à 12 mpl dans 66% des cas (n=9 cerveaux). J'ai ré-analysé sous cet angle toutes les expériences d'immunomarquage que j'avais générées à la suite d'une lésion mécanique du TO sous cet angle. J'ai observé ce pont de cellules entre le TO et le TS dans 65% des cas (n=45 cerveaux) de 1 dpl à 3 mpl. L'analyse de la lignée *Tg(gfap:GFP)* à 3 dpl et 3 mpl permet de montrer que ce pont est glial (**figure 36**).

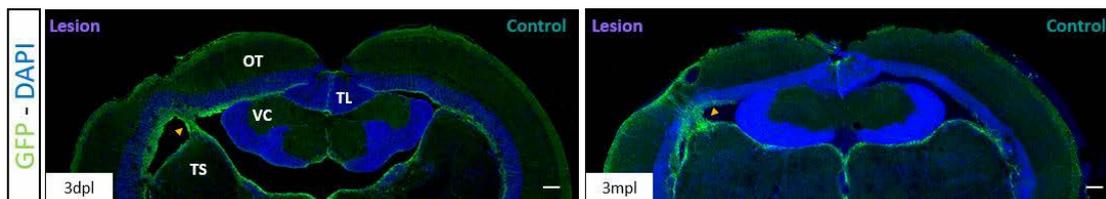


Figure 36 : Mise en évidence d'un pont glial entre toit optique et torus semicircularis dans des cerveaux lésés de la lignée *Tg(gfap:GFP)* à 3dpl et 3 mpl.

Immuno-marquage anti-GFP (en vert), marquage nucléaire (DAPI) (en bleu). Le pont glial est indiqué par une flèche jaune.

OT : optic tectum, TL : torus longitudinalis, TS : torus semicircularis, VC : valvula cerebelli

Etant donné que ce pont est visible sur certains spécimens dès 1 dpl, il me faut déterminer dans un premier temps s'il résulte directement de la pénétration de l'aiguille lors de la blessure. Pour cela je ré-analyserai les échantillons qui m'ont servi pour l'expérience de TUNEL à 4 hpl, 1 dpl et 3 dpl en me focalisant sur le torus semicircularis.

3. Dissection de la séquence régulatrice Dr830

La séquence régulatrice Dr830 induit l'expression de la GFP dans les cellules neuroépithéliales de la TPZ mais également de manière plus faible dans les cellules épendymogliales du TO. L'observation du profil de conservation de la séquence régulatrice Dr830 sur la database UCSC montre que cette région présente deux pics de conservation, que j'ai nommés A et B (**figure 37**).

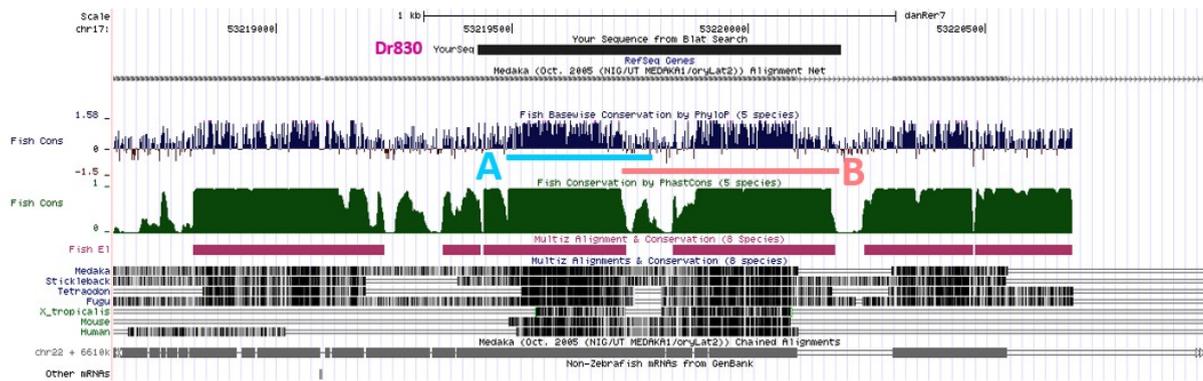


Figure 37 : Profil de conservation observé pour la séquence régulatrice Dr830. Les séquences A (en bleu) et B (en rose) correspondent aux deux pics de conservation au sein de la séquence Dr830.

Nous avons émis l’hypothèse que ces deux pics de conservation pouvaient correspondre aux deux domaines d’expression de l’enhancer Dr830. J’ai établi deux nouvelles lignées transgéniques stables, la *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* et *Tg(Dr830-B:nfsB-GFP)* et j’ai analysé leur profil d’expression à différents stades du développement (**figures 38 et 39**).

L’expression de la GFP induite par la séquence régulatrice Dr830-A est restreinte au TO et se situe au niveau de la PML quel que soit le stade de développement (**figure 38**). Ces cellules sont positives au marqueur de prolifération PCNA (Proliferating cell nuclear antigen).

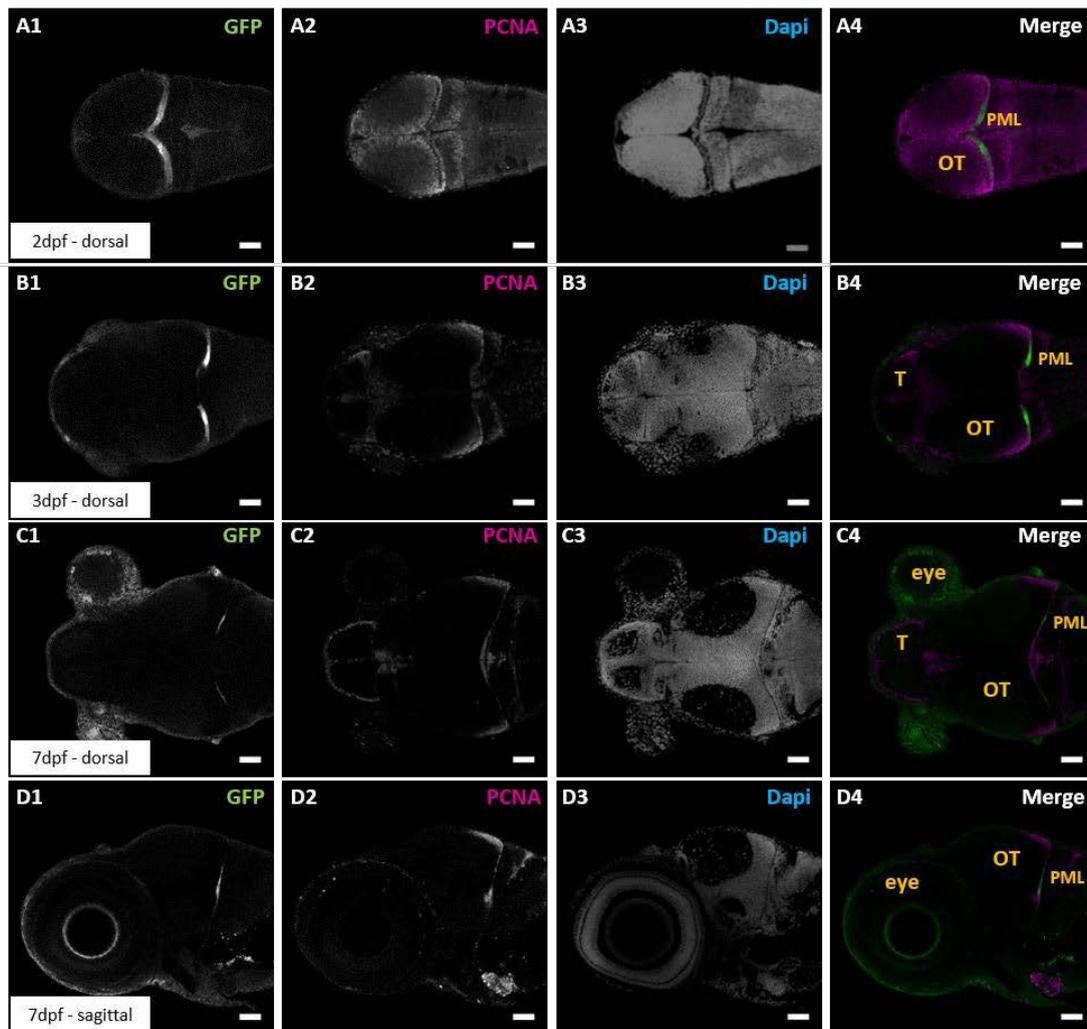


Figure 38 : La lignée *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* présente une expression spécifique de la PML au cours du développement.

- A. Coupe optique d'un embryon de *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* à 2dpf en vue dorsale. A1. Immunomarquage anti-GFP, A2. Immunomarquage anti-PCNA, A3. Marquage nucléaire (DAPI), A4. Merge.
- B. Coupe optique d'une larve *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* à 3dpf en vue dorsale. B1. Immunomarquage anti-GFP, B2. Immunomarquage anti-PCNA, B3. Marquage nucléaire (DAPI), B4. Merge
- C. Coupe optique d'une larve *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* à 7dpf en vue dorsale. C1. Immunomarquage anti-GFP, C2. Immunomarquage anti-PCNA, C3. Marquage nucléaire (DAPI), C4. Merge
- D. Coupe optique d'une larve *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* à 7dpf en vue sagittale. D1. Immunomarquage anti-GFP, D2. Immunomarquage anti-PCNA, D3. Marquage nucléaire (DAPI), D4. Merge

OT : optic tectum, PML : peripheral midbrain layer, T : telencephalon

Barre d'échelle 50µm

Au stade larvaire 7 dpf, la séquence régulatrice Dr830-B conduit l'expression de la GFP dans des cellules de la rétine, du TO, du cervelet et du rhombencéphale (**figure 39**). Sur un plan de

coupe horizontale superficielle du TO, j'ai observé des cellules GFP positives co-marquées avec PCNA (**figure 39A**). Des cellules différenciées sont également visibles dans un plan de coupe horizontal plus profond (**figure 39B**) et en vue sagittale (**figure 39C**).

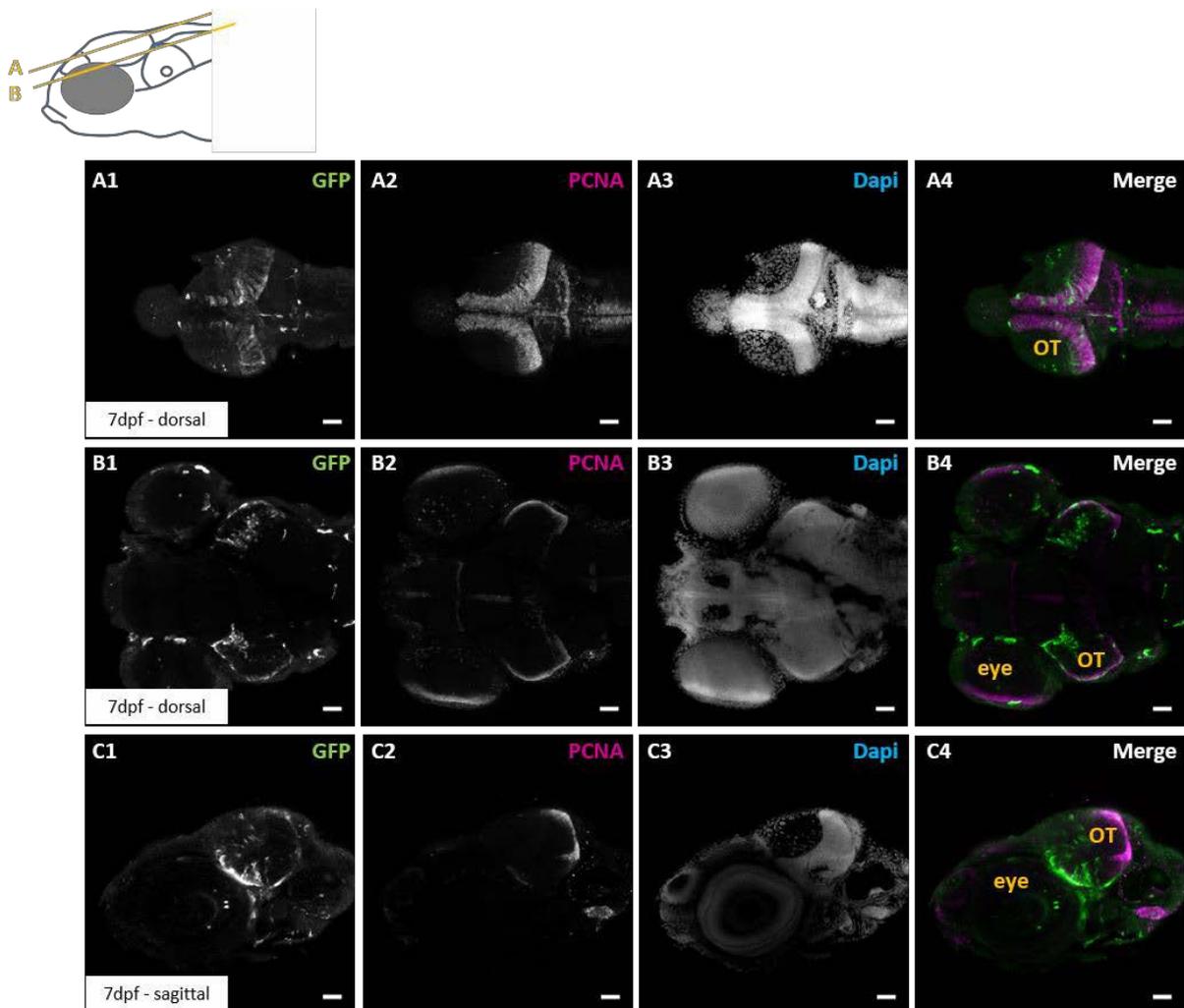


Figure 39 : La lignée *Tg(Dr830-B:nfsB-GFP)* marque des progéniteurs et des cellules différenciées dans le TO au cours du développement.

- A. Coupe optique d'une larve *Tg(Dr830-B:nfsB-GFP)* à 7dpf en vue dorsale à un niveau de coupe très superficiel. A1. Immuno-marquage anti-GFP, A2. Immuno-marquage anti-PCNA, A3. Marquage nucléaire (DAPI), A4. Merge.
- B. Coupe optique d'une larve *Tg(Dr830-B:nfsB-GFP)* à 7dpf en vue dorsale à un niveau de coupe plus ventral. B1. Immuno-marquage anti-GFP, B2. Immuno-marquage anti-PCNA, B3. Marquage nucléaire (DAPI), B4. Merge
- C. Coupe optique d'une larve *Tg(Dr830-B:nfsB-GFP)* à 7dpf en vue sagittale. C1. Immuno-marquage anti-GFP, C2. Immuno-marquage anti-PCNA, C3. Marquage nucléaire (DAPI), C4. Merge

Barre d'échelle 50µm

L'expression des lignées *Tg(Dr830-A:nfsB-GFP)* et *Tg(Dr830-B:nfsB-GFP)* doit encore être analysée chez l'adulte.

Au cours du développement, l'expression de Dr830A correspond à une sous partie de l'expression de Dr830 car la séquence non codante Dr830A est active dans la PML. L'expression de Dr830B est quant à elle plus large que celle de Dr830.

CHAPITRE 3 – ETUDE DES CAPACITES DE REGENERATION NEURONALE DU TECTUM CHEZ LA LARVE DE POISSON ZEBRE PAR IMAGERIE LIVE

I- Introduction

L'imagerie sur animal vivant dite « live imaging » permet d'observer la dynamique du processus de régénération sur un même individu. Ce type d'imagerie peut être réalisé en continu pendant plusieurs jours. Par exemple, l'imagerie live du crustacé *Parhyale hawaiiensis*, amputé d'une patte, a permis d'identifier les cellules progénitrices à l'origine de l'épiderme régénéré (Alwes et al., 2016). Cette technique a également permis de détecter et de caractériser plusieurs types cellulaires nécessaires à la régénération de l'annélide d'eau douce *Pristina leidy* à la suite de l'amputation d'une partie de son corps (Zattara et al., 2016). Ces expériences présentent des difficultés techniques, car l'animal blessé doit être immobilisé parfois pendant plusieurs jours mais dans ces exemples, les organes d'intérêt sont externes, directement visibles donc plus faciles à imager. Pour suivre le processus de régénération sur de plus longues durées, l'animal peut être imagé quelques minutes par jour tous les jours et être placé le reste du temps dans ses conditions d'élevage optimales. Réduire les durées d'imagerie va permettre d'utiliser des techniques de microscopie offrant une meilleure pénétration et ainsi visualiser des processus de régénération sur des organes internes. Ces conditions ont permis de suivre la régénération neuronale du pallium dorsal d'axolotl adulte pendant 28 jours par imagerie à résonance magnétique (Amamoto et al., 2016). Dans cette étude, l'imagerie a permis de montrer la dynamique rapide de la fermeture de la plaie.

En contexte de régénération, l'imagerie live a été utilisée chez l'embryon et la larve de poisson zèbre pour étudier le rôle des macrophages et des neutrophiles au cours de la régénération de la nageoire caudale (Li et al., 2012) et l'implication des cellules de Schwann dans la régénération des nerfs périphériques (Xiao et al., 2015). Cette technique a également été utilisée pour étudier la régénération neuronale dans le télencéphale de poisson zèbre adulte (Barbosa et al., 2015) et a révélé que les progéniteurs gliaux, à l'origine de nouveaux neurones, se divisent de manière symétrique au cours de la régénération.

J'ai voulu étudier la régénération neuronale du TO chez le poisson zèbre par imagerie live à partir de 7 dpf. A ce stade, le poisson zèbre ne peut pas être considéré comme adulte.

Néanmoins, d'un point de vue fonctionnel, l'animal se nourrit et fuit les prédateurs. Son comportement visuel est très performant à ce stade et a été bien étudié. Le TO traite donc les informations visuelles. D'un point de vue structurel, la prolifération du TO est restreinte à sa périphérie comme chez l'adulte. Tout ceci indique que les processus de régénération induits par une lésion ne peuvent pas être confondus avec des processus développementaux comme cela pourrait être le cas si l'étude de la régénération était faite plus précocément. Pour visualiser la mort et la régénération neuronale, j'ai utilisé la lignée *Tg(P3001t:gal4);Tg(UAS:GFP)* (**figure 40**). Cette lignée, donnée par Filippo Del Bene, est issue d'une capture de gène (gene trap). Au stade 7 dpf, la GFP est exprimée majoritairement au niveau du TO et de la rétine (**figure 40A et B1**). Dans le TO, à l'exception des cellules de la PML, les cellules sont toutes marquées par la GFP donc sont vraisemblablement des cellules en cours de différenciation ou des neurones (**figure 40B2**).

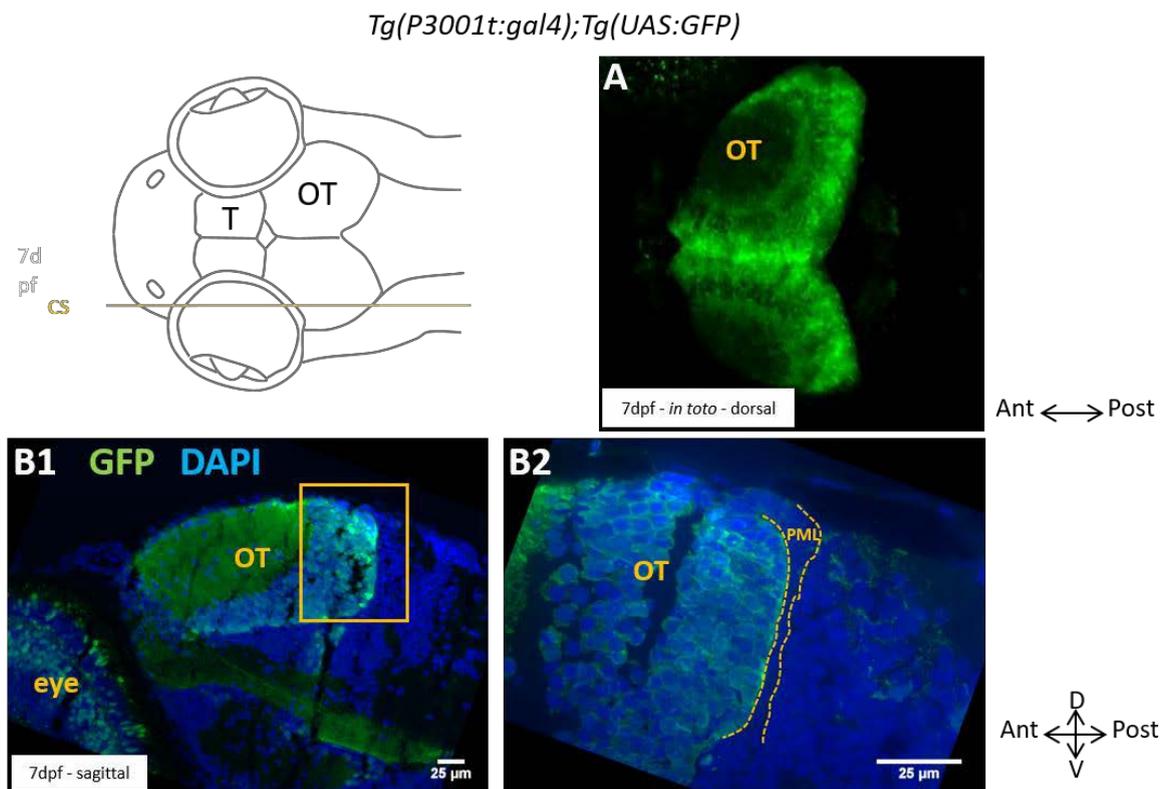


Figure 40 : Patron d'expression du double transgénique *Tg(P3001t:gal4);Tg(UAS:GFP)* à 7 dpf.

A. Expression de la GFP endogène chez la larve *in toto* en vue dorsale (photo fournie par Filippo Del Bene).

B1. Immuno-marquage anti-GFP et marquage nucléaire (DAPI) sur coupe sagittale.

B2. Grossissement de la région délimitée par le rectangle jaune en B1

OT : optic tectum, PML : peripheral midbrain layer, T : telencephalon

J'ai mis au point deux protocoles pour induire la mort neuronale dans le TO chez la larve de poisson zèbre: le premier par lésion chimique et le second par photo-ablation. Je n'ai pas utilisé une méthode de lésion mécanique étant donné la petite taille de l'animal à ce stade.

II- Résultats

1. Régénération neuronale à la suite d'une lésion chimique

Pour induire une ablation cellulaire de manière spécifique, j'ai utilisé le système nitroréductase/métronidazole présenté dans la partie I-2 du chapitre 1 des résultats. Comme la lignée marquant les cellules du TO exprime l'activateur transcriptionnel Gal4, j'ai croisé ces poissons avec une lignée $Tg(UAS:nfsB-mCherry)$ (Davison et al., 2007) obtenue par M.J. Parsons permettant d'obtenir des larves triples transgéniques $Tg(P3001t:gal4)$; $Tg(UAS:GFP)$; $Tg(nfsB-mCherry)$ (**figure 41**).

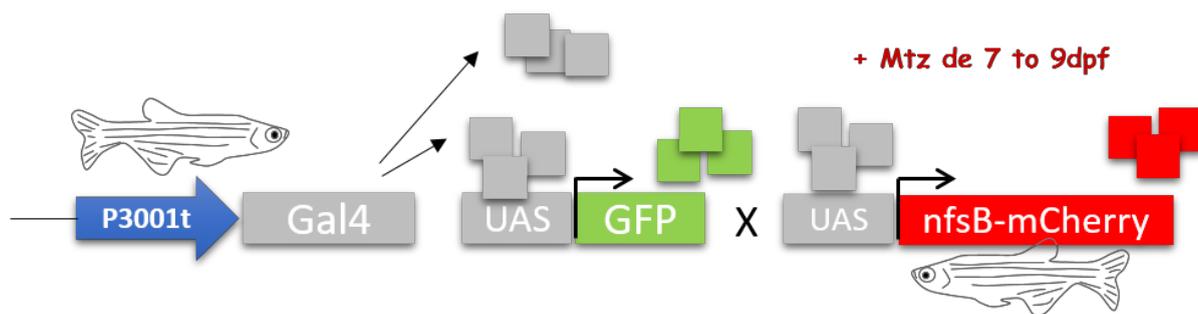


Figure 41 : Croisement des lignées transgéniques permettant d'obtenir des larves $Tg(P3001t:gal4)$; $Tg(UAS:GFP)$; $Tg(nfsB-mCherry)$ en vue d'une ablation chimique à 7 dpf.

Mtz : metronidazole

J'ai incubé des larves $Tg(P3001t:gal4)$; $Tg(UAS:GFP)$; $Tg(nfsB-mCherry)$ (sélectionnées sur la base de la double fluorescence verte et rouge) au stade 7 dpf dans une solution de métronidazole à 10mM pendant 48h. J'ai ensuite imagé chaque larve individuellement pendant plusieurs jours après traitement ou non au métronidazole (**figure 42**).

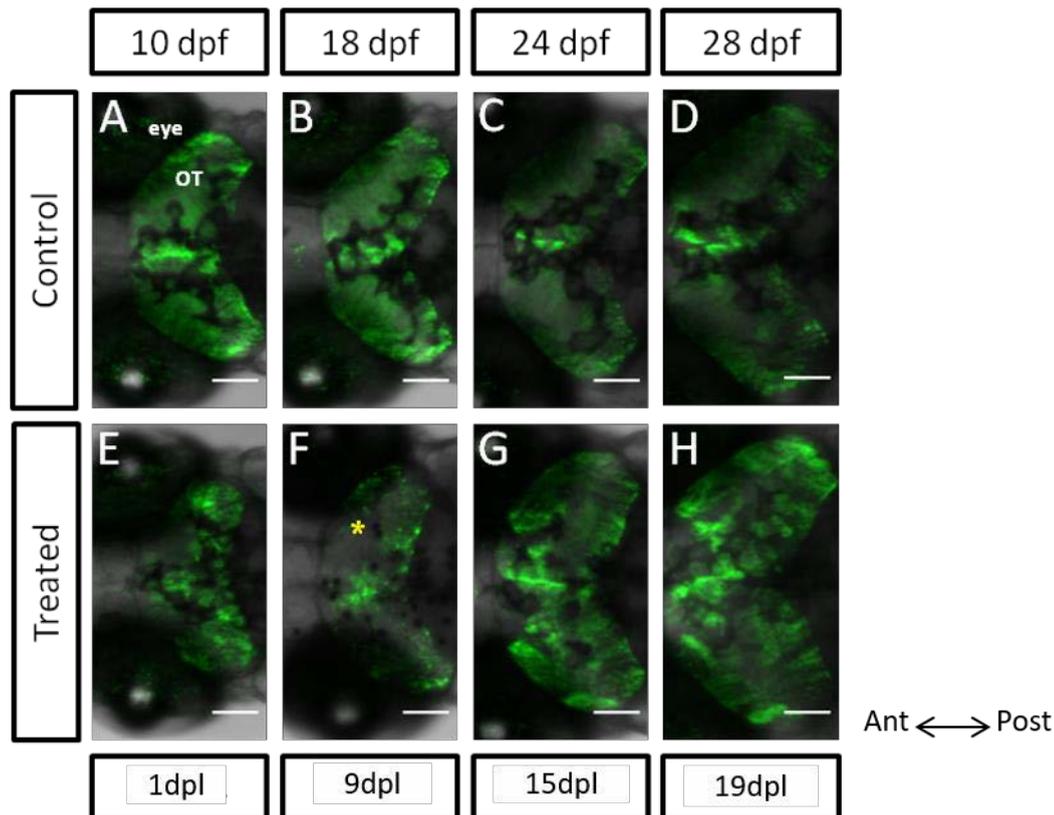


Figure 42 : Mort et régénération de cellules différenciées à la suite d'un traitement au métronidazole sur des larves de poisson zèbre *Tg(P3001t:gal4); Tg(UAS:GFP); Tg(nfsB-mCherry)*.

A-D. Les larves contrôles n'ont pas été traitées au Mtz, la même larve a été observée à 10, 18, 24 et 28 dpf (n=5).

E-H. La même larve traitée a été observée à 10, 18, 24 et 28 dpf soit 1, 9, 15 et 19 dpl (n=5). L'étoile jaune indique la perte d'expression de la GFP.

Barres d'échelle 100µm

OT : optic tectum

Un jour après la fin du traitement au métronidazole, j'ai observé une baisse de fluorescence dans la partie centrale du TO. A 9 dpl, il y a une diminution très probable du nombre de cellules différenciées, basée sur l'absence d'expression de la GFP (étoile jaune). A 15dpl, la GFP est de nouveau exprimée dans tout le TO suggérant une régénération neuronale de la larve de poisson zèbre.

Sur coupes histologiques (**figure 43**), j'ai observé de nombreuses cellules pycnotiques dans le tectum à 1dpl (**figure 43E**, tête de flèche rose) alors qu'il n'y a pas de cellules en train de mourir dans le TO de la larve contrôle (**figure 43B**). La mort neuronale est spécifique de cette structure car je n'ai pas vu de cellules pycnotiques dans d'autres parties du cerveau (**figure 43D**). A 19 dpl, des cellules du TO ont régénérées mais la structure du TO est altérée (**figure 43F**). En effet, la PGZ est irrégulière (tête de flèche verte).

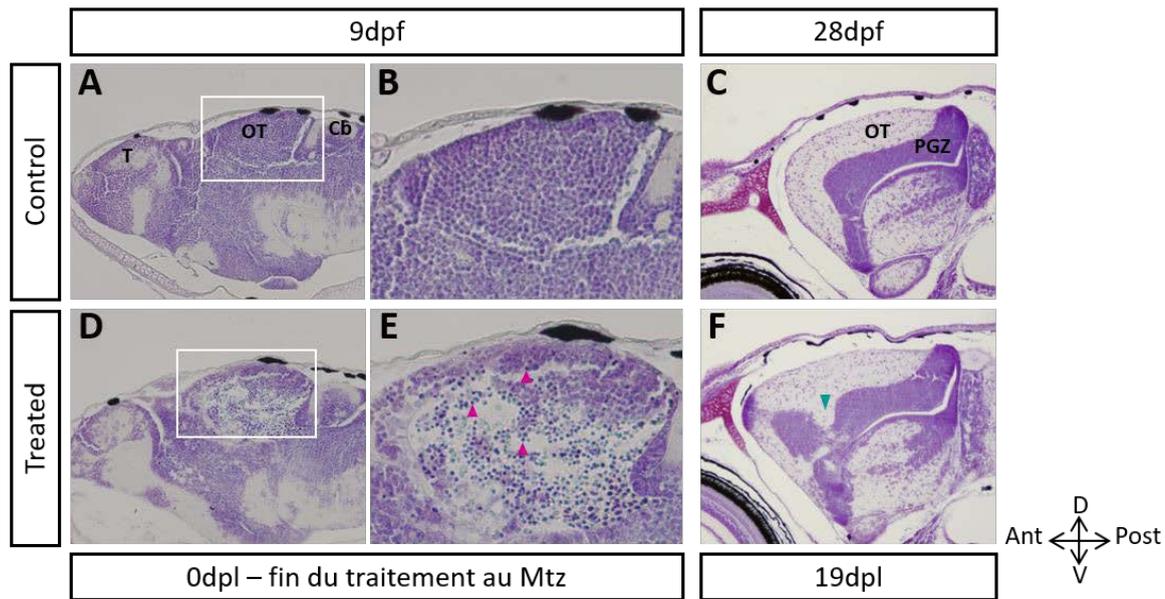


Figure 43 : Mort cellulaire et régénération de larves contrôles ou traitées au Mtz fixées à la fin du traitement ou à 19dpl.

Coloration au crésyl violet et thionine sur coupes sagittales

A-B. Larve non traitée au Mtz à 9dpf. C. Larve non traitée au Mtz à 28dpf. D-E. Larve à la sortie du bain de Mtz, quelques exemples de cellules pycnotiques sont indiqués par des têtes de flèches roses. F. Larve à 19 dpl soit 28dpf, l'altération de la PGZ est indiquée par une tête de flèche verte.

Ce : cerebellum, Mtz : metronidazole, OT : optic tectum, PGZ : periventricular grey zone, T : telencephalon

L'utilisation du système Ntr/Mtz chez la larve à 7 dpf a donc permis d'induire la mort de neurones de manière spécifique dans le TO. Quinze jours après la fin du traitement au Mtz, de nouveaux neurones ont été générés. Toutefois, à 19 dpl, la structure topographique du tectum est altérée.

2. Régénération neuronale à la suite d'une photoablation

La mort cellulaire peut être obtenue par brûlure localisée grâce à un laser. J'ai utilisé un microscope 2 photons pour induire la mort d'un groupe de neurones dans le TO de larves *Tg(P3001t:gal4); Tg(UAS:GFP)*. En effet, l'expression forte et spécifique de la GFP dans le TO de cette lignée permet de viser précisément ce tissu et de visualiser l'effet de la photoablation. Les larves, à 7dpf, ont été anesthésiées et montées en position dorsale dans de l'agarose à faible point de fusion. J'ai zoomé sur la région centrale d'un des deux lobes du TO puis sélectionné une certaine épaisseur de tissu (70 μm) qui a été soumise au rayonnement. J'ai restreint la zone cible de telle manière à ce que ni la peau du poisson ni les régions profondes

du SNC ne soient touchées. Les larves ont été imagées avant et à la fin de la photoablation, ainsi que pendant les deux jours suivants l'ablation (**figure 44**).

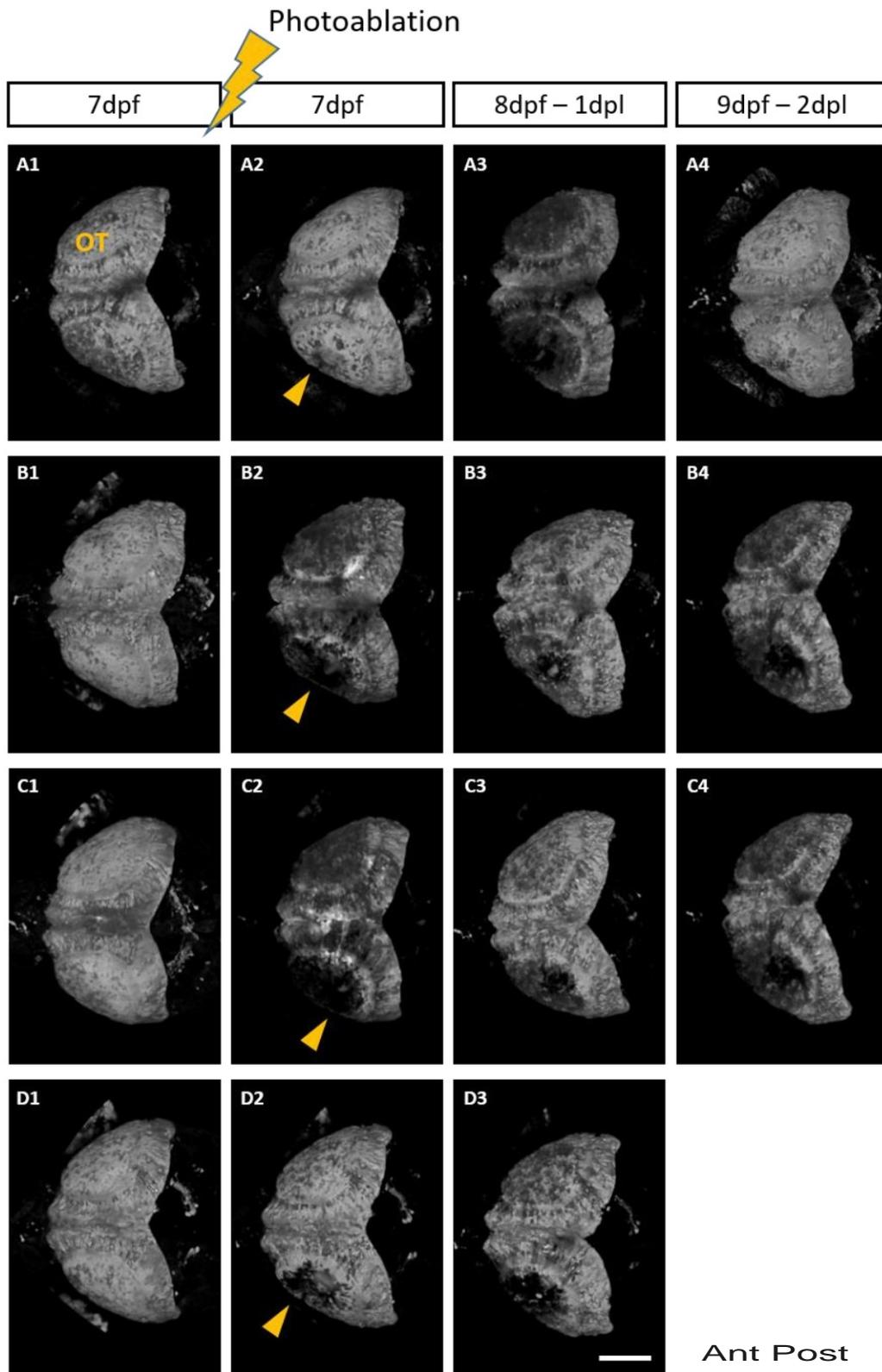


Figure 44 : Lésion tissulaire du TO par photablation sur des larves de poisson zèbre *Tg(P3001t:gal4); Tg(UAS:GFP)*. Chaque ligne correspond à un individu. La lésion est indiquée par une tête de flèche jaune.

Barre d'échelle : 100µm

Le site de lésion est visible dès la photoablation achevée, il n'a plus d'expression de la GFP dans cette région du TO. Deux jours après la blessure, la lésion est toujours visible.

A 1 dpl, la lésion est caractérisée sur coupes histologiques (**figure 45**, indiqué par tête de flèche jaune). Un trou est apparu dans la région cible du TO. La blessure est spécifique du TO, la peau de l'animal n'a pas été touchée. De même, les autres structures du SNC sont indemnes. Sept jours après la photoablation, le trou a été en partie comblé (**figure 45B**). Toutefois, la trace de la brûlure est encore visible, le tissu est nécrosé.

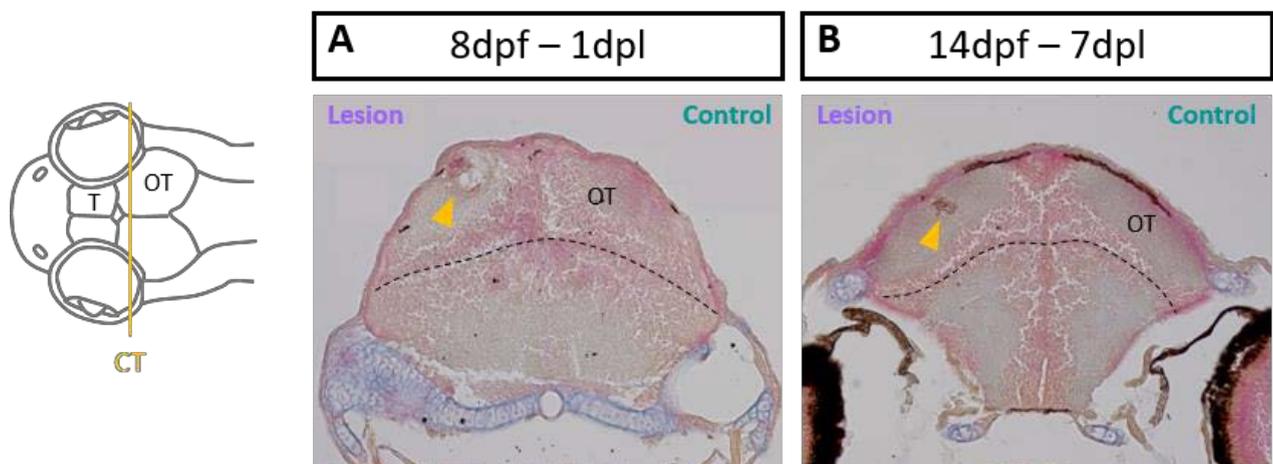


Figure 45 : Mort cellulaire et régénération de larves *Tg(P3001t:gal4); Tg(UAS:GFP)* photoablatées à 1 et 7 dpl.

Coloration au picro-mallory sur coupes transversales. Le site de lésion est indiqué par une tête de flèche jaune.

III- Perspectives

Les techniques d'ablation chimique et de photoablation sont efficaces pour induire la mort neuronale chez la larve de poisson zèbre spécifiquement dans le TO. La photoablation, lorsqu'elle est réalisée sur un seul des deux lobes du TO, permet d'avoir sur un même animal un côté contrôle et un côté lésé. Les poissons survivent bien aux deux types de lésion, toutefois deux étapes sont critiques à la survie du poisson : les nombreuses manipulations de l'animal induites par les montages-démontages réguliers pour l'imagerie et l'individualisation des larves.

En plus de l'étude de la régénération neuronale chez l'adulte avec une lésion mécanique, j'ai mis au point deux techniques pour étudier la régénération en temps réel chez les larves en ciblant les neurones. Je vais pouvoir compléter mon analyse chez l'adulte et visualiser le recrutement de progéniteurs impliqués dans ce processus. En croisant la lignée *Tg(P3001t:gal4); Tg(UAS:GFP)* avec la lignée *Tg(Dr830:ERT2-Cre-ERT2);Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)*, j'obtiendrai des larves dans lesquelles les neurones exprimeraient la GFP et où la Cre pourra être activée au moment voulu sous le contrôle de l'enhancer Dr830. Je souhaiterais faire l'expérience suivante : bain de tamoxifène à 6 dpf pendant 24h, puis photablation à 7 dpf et suivi du recrutement possible des progéniteurs neuroépithéliaux du TO en vue de la régénération neuronale. La même expérience pourra être réalisée avec la lignée *Tg(Her4:ERT2-Cre-ERT2);Tg(actb2:loxP-STOP-loxP-hmgb1-mCherry)* pour déterminer la contribution des cellules Her4 dans le processus de régénération du TO.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Identification d'un enhancer ciblant des progéniteurs constitutifs du TO

J'ai réalisé un crible de séquences non codantes dans le but d'obtenir des lignées s'exprimant spécifiquement dans des cellules progénitrices ou des neurones du TO. Sur les 11 séquences non codantes ultra-conservées testées, 4 (36%) ont conduit à une expression visible dans le SNC. Le fait que ces éléments soient évolutivement conservés indique que probablement ces séquences servent à la régulation transcriptionnelle. Il peut donc sembler étonnant que seules 36% de ces séquences sont actives chez le poisson zèbre. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat. Tout d'abord, le choix de la protéine fluorescente rapportrice dans le cadre d'un crible peut être remis en question. Le crible des embryons en F0 a été réalisé sous loupe fluorescente. Dans ces conditions, avec un niveau d'expression de la KillerRed membranaire relativement faible, il est possible de passer à côté d'embryons positifs. Ensuite, les embryons ont été criblés entre 2 et 4 dpf et il est possible que certaines séquences non codantes puissent être actives plus tôt ou plus tard dans le développement. Enfin, les séquences non codantes peuvent être des enhanceurs transcriptionnels mais également des silencers de gènes et dans ce cas il n'est pas possible de visualiser leur activité. A titre de comparaison, 45% des éventuels éléments régulateurs de gènes identifiés ont été validés comme enhanceurs de l'expression de gènes chez l'embryon de souris (Pennacchio et al., 2006).

Les deux lignées transgéniques stables, *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* et *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)*, établies à la suite du crible présentent une expression dans la TPZ. Il est intéressant de noter qu'aucune séquence testée chez le poisson zèbre n'a permis de marquer des neurones du tectum. L'évaluation des séquences régulatrices, ayant servi dans ce crible, a été réalisée chez la souris au stade embryonnaire E11.5, stade auquel les cellules du colliculus supérieur sont encore essentiellement prolifératives (Edwards et al., 1986). Il est donc possible que mon crible ait été biaisé vers des séquences régulatrices actives de progéniteurs spécifiés pour donner du cerveau moyen. Le maintien de l'activité de ces séquences régulatrices au niveau des progéniteurs du TO chez le poisson zèbre adulte suggère que la régulation transcriptionnelle chez l'adulte pourrait être en partie similaire à celle utilisée lors du développement. Ce crible m'a permis d'identifier la séquence non codante Dr830, active dans les progéniteurs du TO.

Dr830, un enhancer de *meis2a*

J'ai généré et caractérisé la lignée *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* exprimant la GFP dans les cellules neuroépithéliales du TO chez la larve et l'adulte sous le contrôle d'un enhancer de *meis2a*. Le domaine d'expression inclut la PML et la TPZ. Dr830 est un enhancer potentiel de *meis2a* car :

1. La synténie de Dr830 est conservée, c'est à dire que l'ordre des gènes flanquants dans cette région est conservé entre les vertébrés. L'élément Dr830 est flanqué des gènes *meis2* et *spred1*.
2. La GFP du *Tg(Dr830:nfsB-GFP)* et le gène *meis2a* sont exprimés dans la TPZ au cours du développement et chez l'adulte. Comme Dr830 est une courte séquence régulatrice isolée, elle ne récapitule pas nécessairement la totalité du patron d'expression *meis2a*, qui est plus large.
3. Aucun des autres gènes présents autour de cet enhancer ne semble être exprimé dans le TO du poisson zèbre au cours du développement.
4. L'expression de l'enhancer à partir de 24h de développement est spécifique du TO en développement, ce qui est en accord avec le rôle de Meis2 comme spécificateur du TO (Agoston and Schulte, 2009; Agoston et al., 2012; Rapacioli et al., 2016).
5. La protéine Meis2 est liée à la progression du cycle cellulaire dans des neuroblastomes (Zha et al., 2014). L'enhancer Dr830 induit l'expression de la GFP dans des cellules en prolifération du TO.

Chez le poisson zèbre, il existe deux paralogues du gène *meis2* : *meis2a* et *meis2b*. Les photos du patron d'expression de *meis2b* sur la base de données ZFIN montrent que ce gène est exprimé dans le TO au cours du développement. Le locus du gène *meis2a* et la séquence régulatrice Dr830 sont sur le chromosome 17, le locus du gène *meis2b* se situe sur le chromosome 20. Il reste envisageable que la séquence régulatrice Dr830 contrôle aussi l'expression du gène *meis2b* même en n'étant pas sur le même chromosome (Bartkuhn and Renkawitz, 2008).

Les progéniteurs marqués par l'enhancer Dr830 sont à l'origine de la formation du TO

Une étude récente a montré que les cellules positives pour her5 de la PML constituent le pool de progéniteurs le plus en amont, au moins jusqu'à 5 dpf (Galant et al., 2016). Les expériences de lignage cellulaire après des recombinaisons à 2 ou 5 dpf ont montré que les cellules positives pour her5 génèrent tous les types cellulaires du TO en se basant sur la répartition des polyclones obtenus dans le TO. Ces auteurs n'ont cependant pas pu effectuer des recombinaisons après 5

dpf. A ce jour, à ma connaissance, aucune lignée de poisson zèbre marquant des progéniteurs du TO chez l'adulte n'a été décrite. L'expression dirigée dans les cellules de la TPZ et de la PML aux stades larvaires et adulte obtenue dans la lignée *Tg(Dr830:nfsb-GFP)* m'a conduit à générer une lignée *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)*. Cette dernière est utilisable pour des expériences de lignage cellulaire conditionnel, afin de déterminer la contribution de ces cellules à la neurogénèse en condition homéostatique au cours du développement et chez l'adulte. Les expériences de lignage cellulaire avec une recombinaison à 2 dpf ont montré que ces cellules contribuent à la formation du TO. Ces résultats suggèrent que la population de cellules her5 positives est incluse dans la population cellulaire de notre lignée transgénique. Les expériences de recombinaison à 7dpf et 2mpf montrent que les cellules positives à Dr830 contribuent toujours à la formation/croissance du TO. Des expériences d'incorporation de BrdU montrent un maintien du pool de progéniteurs sur le long terme car dans la descendance des cellules Dr830, des progéniteurs BrdU⁺ sont toujours présents. Mes résultats ont donc prouvé que ces cellules progénitrices, présentes précocement au cours du développement, restent actives dans le TO chez l'adulte et continuent tout le long de la vie à produire de nouvelles cellules. J'ai donc établi la première lignée transgénique qui permet de suivre le devenir des cellules neuroépithéliales dans le TO dans des conditions homéostatiques chez la larve et chez l'adulte. Il serait intéressant dans le futur d'utiliser cette lignée pour effectuer des lignages de cellules uniques qui apporteraient plus de détail sur la probable hétérogénéité de cette population de progéniteurs. Par la suite, j'ai utilisé cette lignée pour déterminer la contribution de ces cellules en contexte de régénération.

Régénération cellulaire à la suite de blessures mécanique, chimique et photoablation

J'ai induit la mort neuronale dans le TO par ablation chimique et photablation chez la larve et par lésion mécanique chez l'adulte dans tous les cas avec un taux de survie important des animaux blessés. A la suite d'une ablation chimique à 7 dpf dans la lignée *Tg(P3001t:gal4);Tg(UAS:GFP)*, qui marque les neurones à ce stade, j'ai observé une diminution du nombre de cellules différenciées dans la partie centrale du TO, basée sur la disparition d'expression de la GFP. Quelques jours après, le retour de l'expression de la GFP dans cette partie du TO suggère que cette structure est capable de régénérer des neurones. Toutefois, le TO semble ne restaurer que partiellement son architecture que ce soit après une lésion chimique chez la larve (la PGZ est altérée) ou mécanique chez l'adulte (présence d'un pont glial entre le TO et le torus semicircularis qui reste présent jusqu'à 1 an post-lésion).

Le poisson zèbre a la capacité de régénérer de nombreux organes comme le cœur (voir pour revue González-Rosa et al., 2017), le pancréas (voir pour revue Prince et al., 2017) et les nageoires (Monaghan and Maden, 2013). Il a également la capacité de régénérer des régions de son SNC comme le télencéphale (Ayari et al., 2010; Kroehne et al., 2011; März et al., 2011; Baumgart et al., 2012; Kishimoto et al., 2012), la moelle épinière (Becker et al., 1997; Reimer et al., 2008; Kuscha et al., 2012) et la rétine (voir pour revue Lenkowski et al., 2013). Cependant, les capacités de régénération neuronale du poisson zèbre sont peut-être à modérer car ni le TO ni le cervelet (Kaslin et al., 2017) ne semblent être capable de régénérer complètement. Le manque de capacité de régénération est-il lié à la structure en couches de ces deux structures ? Cela paraît peu probable car la rétine est également une structure corticale et pourtant elle régénère tous ses neurones manquants après lésion.

Je n'ai pas étudié les conséquences de la lésion sur le comportement de l'animal. Est-ce qu'une lésion du TO affecte la vision du poisson ? Est-ce que le poisson peut récupérer des capacités visuelles à la suite d'une régénération du TO ? Pour faire ces tests comportementaux, on pourrait croiser la lignée *Tg(P300It:gal4);Tg(UAS:GFP)* avec une lignée *Tg(UAS:GCaMP7)* (Muto et al., 2013), induire la mort neuronale dans les deux lobes du TO par photoablation chez la larve et enregistrer les pics de calcium, correspondant à une activité neuronale, au cours d'un stimulus visuel comme la présence d'une proie (par exemple une paramécie). Chez l'adulte, on pourrait tester le défaut de perception de stimuli visuel à l'aide d'un test de comportement basé sur la fuite du poisson lorsqu'il voit une ombre (Colwill and Creton, 2011). Mais la visualisation en direct de l'activité neuronale chez l'adulte est plus problématique à cause de la forte pigmentation et de l'épaisseur des tissus recouvrant le cerveau. Une alternative serait de vérifier l'activité des neurones par immunohistochimie. Il existe en effet des marqueurs de neurones activés à la suite de différents stimuli comme le facteur de transcription c-Fos. La phosphorylation de la protéine ribosomale S6 et de ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) permet l'activation de la protéine c-Fos, ces deux molécules sont également utilisés comme marqueurs d'activité neuronale (Knight et al., 2012; Cruz et al., 2013).

Que signifie le pont glial entre le toit optique et le torus semicircularis ?

J'ai observé une jonction entre le torus semicircularis et le toit optique dans une majorité des cas de lésions mécaniques (65% des cas, n=45 cerveaux) qui est toujours visible jusqu'à un an après la lésion. Les « bords » du pont sont composés cellules gliales. A la suite d'une

transsection de la moelle épinière, un pont de cellules gliales bipolaires se forme entre les deux côtés de la moelle et sert de guide pour la croissance des axones (Goldshmit et al., 2012). Le pont glial observé dans le TO est-il similaire au pont glial de la moelle épinière ? Les cellules gliales ventriculaires du TO et du TS deviennent-elles bipolaires ? Quel serait le rôle d'un tel pont entre tectum et TS ? La cinétique de formation entre ces deux structures est différente, le pont glial dans le TO est plus rapide à se former, il est déjà visible à 1dpl, alors que le pont glial de la moelle épinière se forme deux à trois semaines après la lésion. La formation du pont est-elle un effet collatéral des signaux émis au niveau de la lésion ? Je ne peux pas exclure totalement que ce pont n'est pas dû à un mouvement mécanique de l'aiguille qui amènerait des cellules du torus dans le TO ou inversement. Néanmoins, cela paraît peu probable car les extensions gliales observées de part et d'autre du TO et du TS sont toujours parallèles et orientées dans le sens du pont, ce caractère très reproductible ne me paraît pas pouvoir être dû au hasard. Au bout d'un an, ce phénomène ne s'est toujours pas résorbé. De plus, le torus semicircularis est un organe cible des afférences de la ligne latérale et de l'oreille interne. Si cette structure est lésée, cela pourrait affecter l'équilibre du poisson. Or je n'ai observé qu'en de très rare cas des pertes d'équilibre chez le poisson zèbre à la suite d'une lésion mécanique.

Implication de progéniteurs latents et constitutifs dans la régénération du TO

Au cours du processus de régénération, j'ai observé une activation des cellules épendymogliales dans la zone ventriculaire du TO et une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux, localisés dans la TPZ, bien qu'ils soient distants du site de lésion. La réponse à la lésion est donc différente de celle observée dans le pallium et le cervelet où le processus de régénération semble être un reflet de la neurogenèse adulte.

Dans le pallium de poisson zèbre, il y a une complète restauration du tissu après lésion. Des expériences de lignage cellulaire ont montré que ce sont les cellules her4.1 ventriculaires qui réagissent à la blessure, augmentent leur prolifération et génèrent des neuroblastes qui migrent au site de lésion (Kroehne et al., 2011). Les cellules gliales sont la population de cellules souches la plus nombreuse dans le télencéphale. En condition homéostatique, elles génèrent tous les types neuronaux. La seconde population de cellules souches est une population de cellules neuroépithéliales présentes dans les parties latérales du pallium (Dirian et al., 2014). Elles ont été décrites très récemment, après les études sur la régénération du télencéphale. On ne sait pas si ces cellules neuroépithéliales du télencéphale sont impliquées dans le processus de régénération car elles n'expriment pas her4.

Dans le cervelet, la régénération est partielle (Kaslin et al., 2017). Les cellules neuroépithéliales sont les cellules souches prédominantes supportant le processus de régénération à la suite d'une blessure, mais elles ne génèrent que des cellules granulaires, comme en condition homéostatique. Les glios radiales de la zone ventriculaire sont également activées mais très peu nombreuses ce qui indique que cette population cellulaire est épuisée chez l'adulte. Dans ces deux exemples de blessure, la réponse à la lésion est donc une augmentation de prolifération des progéniteurs constitutifs et l'efficacité du processus de régénération est corrélée avec la multipotence de ces progéniteurs.

La réponse régénérative du TO est plus proche de celle de la rétine. Les cellules épendymogliales du TO et les glios de Müller sont activées à la suite d'une lésion. Dans le TO, les cellules épendymogliales ré-entrent dans le cycle cellulaire. Cependant, nous ne savons pas encore si ces cellules ont la capacité de générer les différents types de neurones manquants après la lésion. Dans la rétine, les RGCs se dédifférencient et sont capables de donner tous les différents types de neurones manquants (Fausett and Goldman, 2006; Bernardos et al., 2007; Fimbel et al., 2007). Il pourrait être intéressant dans le futur d'analyser les différences entre les cellules épendymogliales du TO en condition homéostatique et en condition de régénération. Ces cellules sont-elles juste activées ou changent-elles leurs caractéristiques moléculaires ?

J'ai observé une augmentation concomitante de la prolifération des cellules neuroépithéliales à la périphérie du TO. Dans la rétine de poisson zèbre, il n'a pas été observé d'augmentation de prolifération dans la CMZ. Pourquoi ces cellules sont-elles activées ? J'ai utilisé la lignée *Tg(Dr830:ERT2CreERT2)* pour comprendre la contribution des cellules neuroépithéliales dans le processus de régénération du TO. A la périphérie du TO, j'ai observé un plus grand nombre de cellules générées à la suite d'une recombinaison. Ces cellules vont probablement participer à la neurogenèse selon le modèle de tapis roulant cellulaire. Des temps plus long de chasse après les expériences de recombinaison et de lésion permettront de valider ou d'infirmer cette hypothèse. J'ai observé également quelques cellules recombinées autour du site de lésion. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la présence de ces cellules.

1. Les expériences de lignage cellulaire permettent de suivre les descendants des cellules neuroépithéliales à la périphérie du TO. Si des cellules recombinées sont présentes au site de lésion, cela impliquerait donc qu'il y ait eu une migration cellulaire de la périphérie du TO vers le site de lésion.

2. Comme l'enhancer Dr830 est également actif dans les cellules endymogiales du ventricule, les cellules au site de lésion pourraient provenir de glies radiaires qui auraient été recombinaées. Néanmoins cette hypothèse est peu probable car on ne trouve pas d'autres cellules recombinaées ailleurs dans le ventricule ou de l'autre côté du tectum.
3. Si du tamoxifène reste présent dans le tissu, une recombinaison des cellules Dr830 serait toujours possible après la lésion. Les cellules recombinaées pourraient provenir dans ce cas-là des cellules gliales.
4. La dernière hypothèse possible serait qu'un type cellulaire, autre que des progéniteurs ou des glies radiaires, exprime la Cre sous l'effet de la lésion et recombine du fait des restes de tamoxifène dans le tissu.

Les progéniteurs neuroépithéliaux activés sont loin du site de lésion, les cellules gliales activées sont localisées au site de lésion. Ces deux types cellulaires réagissent-ils aux mêmes signaux ? Les glies radiaires situées au site de lésion réagissent à des signaux diffusibles sur de courtes distances. Ces signaux ne sont probablement pas les mêmes que ceux qui induisent la prolifération de NEPs car (1) la cinétique de prolifération de ces progéniteurs est la même (3dpl) et que (2) des cellules gliales seraient activées tout le long du ventricule de la lésion vers la périphérie du TO.

L'enhancer Dr830 réagit à la lésion

L'enhancer Dr830 est suractivé dans les cellules gliales le long du ventricule à la suite d'une lésion. Une séquence régulatrice peut réagir en réponse à une lésion dans le SNC. Récemment, il a été montré qu'une séquence régulatrice du gène *lepb* a été activée à la suite d'une lésion du cœur et des nageoires chez le poisson zèbre (Kang et al., 2016) et que cette séquence régulatrice est active dans des tissus de souris néonatales en condition homéostatique. Cela montre la possibilité des séquences non codantes évolutivement conservées à participer au processus de régénération en réponse à une lésion tissulaire.

La dissection de l'enhancer Dr830 a permis d'obtenir la lignée *Tg(Dr830A:nfsB-GFP)* où l'enhancer est actif uniquement dans la PML au cours du développement et la lignée *Tg(Dr830B:nfsB-GFP)* dont la GFP est exprimée dans des cellules différenciées du TO, dans la rétine et dans le cervelet. Je pourrai tester l'enhancer réagit à la lésion dans une de ces lignées

et ainsi préciser le nombre et l'identité des facteurs de transcription potentiels qui peuvent agir sur l'enhancer en contexte de régénération.

Y-a-t-il une relation directe entre neurogenèse et régénération ?

La production de nouveaux neurones chez les mammifères adultes est limitée au gyrus denté de l'hippocampe et à la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux du cerveau antérieur (Alvarez-Buylla and Lim, 2004). La neurogenèse peut être induite dans des régions quiescentes après lésion mais le nombre de neurones persistants qui en résulte, reste faible, par conséquent la récupération neuronale de ces animaux est limitée (Lindvall et al., 2004). Au contraire, le cerveau de vertébrés non mammaliens adultes comme le poisson zèbre a une grande capacité de neurogenèse. Plusieurs études ont montré un nombre important de zones de prolifération tout le long de l'axe rostro-caudal du cerveau chez les téléostéens (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006; Chapouton et al., 2007). Ces observations ont conduit à établir un lien entre les capacités de neurogenèse et de régénération (Kaslin et al., 2008; Zupanc, 2009). Cependant, certaines régions du SNC chez le poisson zèbre ont la capacité de régénérer car des cellules différenciées vont se dédifférencier en un état progéniteur pour générer les neurones manquants, c'est pourquoi ces cellules sont appelés des progéniteurs latents. C'est le cas notamment de la rétine et c'est ce que mes travaux suggèrent dans le cas du TO, deux structures dont la zone de progéniteurs est connue pour être active tout au long de la vie l'animal car elles ne cessent jamais de croître. Le lien entre neurogenèse et régénération n'est pas donc pas évident. La régénération pourrait faire appel à des mécanismes différents selon les régions du système nerveux considérées. A ce titre, le TO offre l'avantage de présenter une activation de progéniteurs constitutifs et aussi de progéniteurs latents. Une situation qui me semble inédite.

Annexe

ANNEXE

Procédures expérimentales relatives aux résultats présentés dans les chapitres 1 et 3

1. Lignées transgéniques

Les lignées de *Danio rerio* suivantes ont été utilisées : la souche sauvage AB, la souche mutante Casper (White et al., 2008) et la lignée double-transgénique *Tg(P3001t:gal4);Tg(UAS:GFP)* obtenue par Filippo Del Bene (Institut Curie, Paris). J'ai établi deux autres lignées transgéniques stables : *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)*, *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)*.

2. Design du vecteur de transgénèse

Pour générer le vecteur d'expression nécessaire au test des séquences non codantes candidates, j'ai amplifié par PCR le gène *nfsB* à partir du plasmide pCGAd2v45 (Guise et al., 2007) (*nfsB-for*, 5'-atggatatacatttctgtgc-3' ; *nfsB-rev*, 5'-ctccactgcccacttcggttaaggtgatgt-3'). Les gènes qui codent pour le peptide 2A (*p2A-for*, 5'-ggcagtgagagggcagagg-3' ; *p2A-rev*, 5'-tggccaggattctcctcga-3') et la KillerRed membranaire (*KR-for*, 5'-atgctgtgctgtatgagaag-3' ; *KR-rev*, 5'-ttaatcctcgtcgtaccgatgg-3') ont été amplifiés par PCR à partir du plasmide pGAP43-GFP de l'équipe de Muriel Perron (Orsay, France). Les gènes codant pour le peptide2A et la mKR ont été fusionnés en utilisant les oligonucléotides *p2A-for* et *KR-rev*. Les fragments de PCR *nfsB* et *p2A-KR* ont été fusionnés en utilisant les oligonucléotides *nfsB-for(2)*, 5'-gcagatcgctagcaagtgtaccatggatatacatttctgtgc-3' qui contient les sites de restriction NheI et NcoI et *KR-rev(2)*, 5'-gcagatcgcggccgcttaatcctcgtcgtaccgatgg-3', qui contient le site de restriction NotI. Le fragment *nfsB-p2A-mKR* a été inséré par restriction/ligation à l'aide des enzymes de restriction NheI/NotI dans le vecteur de transgénèse pEXP-AMA (Plateforme Amagen, Gif sur Yvette, France). Ce vecteur contient un marqueur de transgénèse, le promoteur β -cristalline de poisson zèbre qui dirige l'expression de la protéine fluorescente CFP dans le cristallin (**figure 46**).

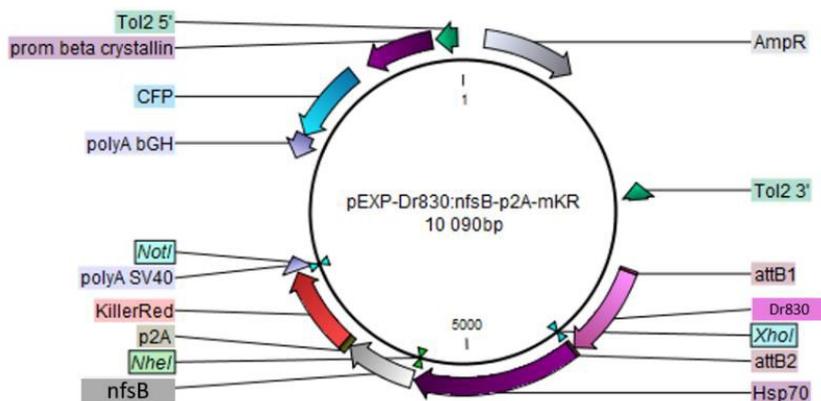


Figure 46 : Carte du vecteur de transgénèse pEXP-Dr830:nfsB-p2A-mKR.

Les séquences régulatrices à tester ont été amplifiées par PCR à partir d'ADN génomique, les oligonucléotides utilisés pour leur amplification sont répertoriés dans le **tableau 1**. Ces séquences ont été insérées dans le vecteur d'expression à l'aide du système de recombinaison Gateway™.

| | Taille (pb) | Oligonucléotide Forward | Oligonucléotide Reverse |
|--------|-------------|-------------------------|-------------------------|
| Dr830 | 865 | GATGCATTCGCAGAGTTTCA | GTCGAAAACACCCTGGCTTT |
| Dr1330 | 502 | TGCTGACTAGTAAAGGTGGTGTG | ACGCAGCATCCTGGTTATTC |
| Dr755 | 710 | CCTCTGAGTCCTTTGAGCTTC | ATAGCCTTGCGATGTTTGGA |
| Dr261 | 1407 | CAGATGAAAGGCAGGAGAGG | TATGTGGGCATCCAATCTCC |
| Dr1791 | 666 | TCCAAGCTCCAACTGATGA | AGGACTGGAAGCACACATT |
| Dr484 | 507 | TCCAGACAGTTTCCCATTTC | ATGGCAAACAGCAAAGTTC |
| Dr1333 | 550 | ACAGTATATCCGCCAACTTGTG | CAAAGGCAAACCGAGAAAAA |
| Dr282 | 301 | TTAAGATCCCAGGCACATCC | AAGGGAAAGAATGAAATGGAGA |
| Dr1213 | 408 | TTCCTCCTGGGAATACTGGA | GCTGAATGTCATCTGACAGAAAT |
| Dr654 | 553 | GTCGCTTTTGTGCTCTTTCC | GCCCTTTTCTACCCACCTTC |
| Dr619 | 898 | TCTCCACTTCGTGGATGACA | GCCCGGCTACATCTGAAAT |

Tableau 1 : Séquences (5'-3') des amorces de part et d'autre des potentielles séquences régulatrices.

Les vecteurs de transgénèse (15 ng/μl) ont été co-injectés avec de l'ARNm de transposase Tol2 (8 ng/μl) dans des embryons de poisson zèbre au stade une cellule à l'aide d'un microinjecteur PicoSpritzer® III.

3. Marquage à l'EdU

Des larves *Tg(Dr282:nfsB-p2A-mKR)* et *Tg(Dr830:nfsB-p2A-mKR)* à 3dpf ont été incubées pendant 4 heures dans 10mM de 5-ethynyl-2'deoxyuridine (EdU, Molecular Probes, Life Technologies), puis fixées dans une solution de PFA à 4%. L'EdU a été détecté à l'aide du kit EdU Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Imaging (Molecular Probes, Life Technologies) selon les instructions du fabricant.

4. Histologie

Les expériences d'immunohistochimie ont été réalisées au stade 3dpf sur cryosections et au stade adulte sur coupes flottantes en agarose. Les cryosections (12µm) ont été préparées comme décrit précédemment (Recher et al., 2013). Les coupes flottantes en agarose (30µm) ont été préparées comme décrit précédemment (Alunni et al., 2010).

Les colorations au crésyl violet et au picro-mallory ont été réalisées sur coupes en paraffine (8µm) comme décrit précédemment (Brombin et al., 2011). Pour la coloration au crésyl violet, les lames ont été déparaffinées par du xylène, réhydratées progressivement en solutions d'éthanol, colorées avec une solution de crésyl violet, lavées avec de l'acide acétique glacial puis déshydratées progressivement en éthanol et montées en Entellan. Pour la coloration au picro-mallory, les lames ont été déparaffinées par du xylène, réhydratées progressivement en solutions d'éthanol, incubées avec une solution de Bouin pendant 1h à 70°C, rincées en eau distillée, incubées en éthanol 95% pendant 5 min, en picro-orange pendant 2 min, en « red-stain » pendant 5 minutes, rincées en acide acétique 0,5%, plongées plusieurs fois pendant 3 min dans la solution « yellow differentiator », rincées en eau distillée, incubées pendant 5 min dans la solution « blue mordant », rincées avec de l'eau distillée, incubées dans le « blue stain » pendant 5 min, rincées brièvement avec de l'acide acétique 0,5%, puis déshydratées en éthanol et montées en Entellan.

5. Immunohistochimie

Les cryosections et les coupes flottantes ont été incubées 1h dans un tampon bloquant (10% NGS, 0,1% Triton en PBS). Les anticorps primaires utilisés sont : anti-mKR (lapin, 1:500, Evrogen), anti-HuC/D (souris, 1:500, clone 16A11, Invitrogen) et anti-GFP (poulet, 1:500, Aves). Les anticorps primaires sont détectés avec des anticorps secondaires appropriés couplés avec des Alexa-Fluor 488, 568, 647 (1:200, Molecular Probes). Les coupes sont montées en milieu de montage Vectashield Hard SetTM (Vector) pour l'observation de la fluorescence.

6. Ablation chimique

Des larves *Tg(P3001t:gal4);Tg(UAS:GFP)* à 7dpf ont été incubées dans une solution de métronidazole (M3761, Sigma) à 10mM (dilué dans de l'embryo medium) pendant 48h à l'obscurité. La solution de métronidazole a été renouvelée après 24h d'incubation.

7. Photoablation

Des larves *Tg(P3001t:gal4);Tg(UAS:GFP)* à 7dpf ont été anesthésiées dans une solution de Tricaine (A5040, Sigma) à 0,016% et immobilisées dans de l'agarose low melting à 1,5% en position dorsale. La photoablation a été réalisée à l'aide d'un microscope 2-Photons (2-Photons Laser Scanning microscope, Leica SP8) par illumination laser (longueur d'onde 750 nm, 75% d'intensité) pendant 30 sec. L'objectif utilisé est un Fluotar VISIR 25x/0.95 WATER. La région d'intérêt a été délimitée en appliquant un zoom numérique x11 sur une épaisseur de 70µm.

8. Imagerie

Les images en lumière transmise ont été réalisées avec un microscope Nikon AZ100 (Camera: Nikon Digital Sight DSRi1; Objectives: AZ-Plan Fluor 5x (O.N. : 0,5/D.T. : 15 mm)). Les images en fluorescence ont été effectuées sur un microscope Axioplan2 couplée à un Apotome (Zeiss) et un microscope confocal (Leica SP8; Objectives: Fluotar VISIR 25x/0.95 WATER; Plan-APOCHROMAT 40x/1.10 WATER).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev. Biol.* *180*, 664–679.

Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.* *85*, 523–569.

Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C.S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M., and Bally-Cuif, L. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol.* *295*, 278–293.

Agoston, Z., and Schulte, D. (2009). Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3311–3322.

Agoston, Z., Li, N., Haslinger, A., Wizenmann, A., and Schulte, D. (2012). Genetic and physical interaction of Meis2, Pax3 and Pax7 during dorsal midbrain development. *BMC Dev. Biol.* *12*, 10.

Alonso, M., Viollet, C., Gabellec, M.-M., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., and Lledo, P.-M. (2006). Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 10508–10513.

Alunni, A., and Bally-Cuif, L. (2016). A comparative view of regenerative neurogenesis in vertebrates. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 741–753.

Alunni, A., Hermel, J.-M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., and Joly, J.-S. (2010). Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.* *70*, 693–713.

Alunni, A., Krecsmarik, M., Bosco, A., Galant, S., Pan, L., Moens, C.B., and Bally-Cuif, L. (2013). Notch3 signaling gates cell cycle entry and limits neural stem cell amplification in the adult pallium. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 3335–3347.

Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* *41*, 683–686.

Alwes, F., Enjolras, C., and Averof, M. (2016). Live imaging reveals the progenitors and cell dynamics of limb regeneration. *ELife* *5*.

Amamoto, R., Huerta, V.G.L., Takahashi, E., Dai, G., Grant, A.K., Fu, Z., and Arlotta, P. (2016). Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *ELife* *5*.

Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., and Heintz, N. (2004). Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron* *41*, 881–890.

Anthony, T.E., Mason, H.A., Gridley, T., Fishell, G., and Heintz, N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes Dev.* *19*, 1028–1033.

Ariga, J., Walker, S.L., and Mumm, J.S. (2010). Multicolor time-lapse imaging of transgenic zebrafish: visualizing retinal stem cells activated by targeted neuronal cell ablation. *J. Vis. Exp. JoVE*.

Arresta, E., Bernardini, S., Bernardini, E., Filoni, S., and Cannata, S.M. (2005). Pigmented epithelium to retinal transdifferentiation and Pax6 expression in larval *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zoolog. A Comp. Exp. Biol.* *303*, 958–967.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* *8*, 963–970.

Ayari, B., El Hachimi, K.H., Yanicostas, C., Landoulsi, A., and Soussi-Yanicostas, N. (2010). Prokineticin 2 expression is associated with neural repair of injured adult zebrafish telencephalon. *J. Neurotrauma* *27*, 959–972.

B

Bally-Cuif, L., and Hammerschmidt, M. (2003). Induction and patterning of neuronal development, and its connection to cell cycle control. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 16–25.

Barbosa, J.S., Sanchez-Gonzalez, R., Di Giaimo, R., Baumgart, E.V., Theis, F.J., Götz, M., and Ninkovic, J. (2015). Neurodevelopment. Live imaging of adult neural stem cell behavior in the intact and injured zebrafish brain. *Science* *348*, 789–793.

Barbosa-Sabanero, K., Hoffmann, A., Judge, C., Lightcap, N., Tsonis, P.A., and Del Rio-Tsonis, K. (2012). Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms. *Biochem. J.* *447*, 321–334.

Barnabé-Heider, F., Göritz, C., Sabelström, H., Takebayashi, H., Pfrieder, F.W., Meletis, K., and Frisé, J. (2010). Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell* *7*, 470–482.

Barreiro-Iglesias, A., Mysiak, K.S., Scott, A.L., Reimer, M.M., Yang, Y., Becker, C.G., and Becker, T. (2015). Serotonin Promotes Development and Regeneration of Spinal Motor Neurons in Zebrafish. *Cell Rep.* *13*, 924–932.

Bartkuhn, M., and Renkawitz, R. (2008). Long range chromatin interactions involved in gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 2161–2166.

Baumgart, E.V., Barbosa, J.S., Bally-Cuif, L., Götz, M., and Ninkovic, J. (2012). Stab wound injury of the zebrafish telencephalon: a model for comparative analysis of reactive gliosis. *Glia* *60*, 343–357.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J., and Martin, J.B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* *321*, 168–171.

Becker, T., Wullmann, M.F., Becker, C.G., Bernhardt, R.R., and Schachner, M. (1997). Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* *377*, 577–595.

Behrman, A.L., Bowden, M.G., and Nair, P.M. (2006). Neuroplasticity after spinal cord injury and training: an emerging paradigm shift in rehabilitation and walking recovery. *Phys. Ther.* *86*, 1406–1425.

Bely, A.E., and Nyberg, K.G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol. Evol.* *25*, 161–170.

- Ben-Hur, T., Ben-Menachem, O., Furer, V., Einstein, O., Mizrachi-Kol, R., and Grigoriadis, N. (2003). Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 623–631.
- Berg, D.A., Kirkham, M., Beljajeva, A., Knapp, D., Habermann, B., Ryge, J., Tanaka, E.M., and Simon, A. (2010). Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 4127–4134.
- Bernardini, S., Gargioli, C., Cannata, S.M., and Filoni, S. (2010). Neurogenesis during optic tectum regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* *52*, 365–376.
- Bernardos, R.L., and Raymond, P.A. (2006). GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr. Patterns GEP* *6*, 1007–1013.
- Bernardos, R.L., Barthel, L.K., Meyers, J.R., and Raymond, P.A. (2007). Late-Stage Neuronal Progenitors in the Retina Are Radial Müller Glia That Function as Retinal Stem Cells. *J. Neurosci.* *27*, 7028–7040.
- Bickenbach, J.B., Brown, C., Burns, D. (2013). A global picture of spinal cord injury in international perspectives on spinal cord injury. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Boniface, E.J., Lu, J., Victoroff, T., Zhu, M., and Chen, W. (2009). FLEX-based transgenic reporter lines for visualization of Cre and Flp activity in live zebrafish. *Genes. N. Y. N 2000* *47*, 484–491.
- Braisted, J.E., and Raymond, P.A. (1992). Regeneration of dopaminergic neurons in goldfish retina. *Dev. Camb. Engl.* *114*, 913–919.
- Braisted, J.E., Essman, T.F., and Raymond, P.A. (1994). Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 2409–2419.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., and Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* *25*, 397–424.
- Broccoli, V., Boncinelli, E., and Wurst, W. (1999). The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature* *401*, 164–168.
- Brockes, J.P., and Kumar, A. (2002). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 566–574.
- Brombin, A., Grossier, J.-P., Heuzé, A., Radev, Z., Bourrat, F., Joly, J.-S., and Jamen, F. (2011). Genome-wide analysis of the POU genes in medaka, focusing on expression in the optic tectum. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *240*, 2354–2363.
- Buckley, C., Carvalho, M.T., Young, L.K., Rider, S.A., McFadden, C., Berlage, C., Verdon, R.F., Taylor, J.M., Girkin, J.M., and Mullins, J.J. (2017). Precise spatio-temporal control of rapid optogenetic cell ablation with mem-KillerRed in Zebrafish. *Sci. Rep.* *7*, 5096.
- Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.-P., Mori, T., and Götz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3581–3586.

Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Britanova, O.V., Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Merzlyak, E.M., Shkrob, M.A., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2006). A genetically encoded photosensitizer. *Nat. Biotechnol.* *24*, 95–99.

Burda, J.E., and Sofroniew, M.V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* *81*, 229–248.

Byrd, C.A., and Brunjes, P.C. (1998). Addition of new cells to the olfactory bulb of adult zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *855*, 274–276.

C

Camand, E., Morel, M.-P., Faissner, A., Sotelo, C., and Dusart, I. (2004). Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 1161–1176.

Cameron, D.A. (2000). Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish. *Vis. Neurosci.* *17*, 789–797.

Cameron, D.A., and Carney, L.H. (2000). Cell mosaic patterns in the native and regenerated inner retina of zebrafish: implications for retinal assembly. *J. Comp. Neurol.* *416*, 356–367.

Cameron, D.A., and Easter, S.S. (1995). Cone photoreceptor regeneration in adult fish retina: phenotypic determination and mosaic pattern formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *15*, 2255–2271.

Carlén, M., Meletis, K., Göritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabé-Heider, F., Yeung, M.S.Y., Naldini, L., et al. (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci.* *12*, 259–267.

Cavodeassi, F., and Houart, C. (2012). Brain regionalization: of signaling centers and boundaries. *Dev. Neurobiol.* *72*, 218–233.

Centanin, L., Hoeckendorf, B., and Wittbrodt, J. (2011). Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell* *9*, 553–562.

Centanin, L., Ander, J.-J., Hoeckendorf, B., Lust, K., Kellner, T., Kraemer, I., Urbany, C., Hasel, E., Harris, W.A., Simons, B.D., et al. (2014). Exclusive multipotency and preferential asymmetric divisions in post-embryonic neural stem cells of the fish retina. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 3472–3482.

Cervený, K.L., Varga, M., and Wilson, S.W. (2012). Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Dev. Neurobiol.* *72*, 328–345.

Chapouton, P., Adolf, B., Leucht, C., Tannhäuser, B., Ryu, S., Driever, W., and Bally-Cuif, L. (2006). *her5* expression reveals a pool of neural stem cells in the adult zebrafish midbrain. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 4293–4303.

Chapouton, P., Jagasia, R., and Bally-Cuif, L. (2007). Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *29*, 745–757.

Chapouton, P., Skupien, P., Hesel, B., Coolen, M., Moore, J.C., Madelaine, R., Kremmer, E., Faus-Kessler, T., Blader, P., Lawson, N.D., et al. (2010). Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 7961–7974.

Chen, J., Magavi, S.S.P., and Macklis, J.D. (2004). Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16357–16362.

Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.-C., and Galliot, B. (2009). Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev. Cell* *17*, 279–289.

Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 4462–4471.

Choi, B.H. (1981). Radial glia of developing human fetal spinal cord: Golgi, immunohistochemical and electron microscopic study. *Brain Res.* *227*, 249–267.

Choi, T.-Y., Ninov, N., Stainier, D.Y.R., and Shin, D. (2014). Extensive conversion of hepatic biliary epithelial cells to hepatocytes after near total loss of hepatocytes in zebrafish. *Gastroenterology* *146*, 776–788.

Colwill, R.M., and Creton, R. (2011). Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Rev. Neurosci.* *22*, 63–73.

Conner, C., Ackerman, K.M., Lahne, M., Hobgood, J.S., and Hyde, D.R. (2014). Repressing notch signaling and expressing TNF α are sufficient to mimic retinal regeneration by inducing Müller glial proliferation to generate committed progenitor cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 14403–14419.

Coolen, M., Bally-Cuif, L. (2008). Microrégulation aux frontières (cérébrales). *Med. Sci.* *24*, 787-789.

Corbo, C.P., Othman, N.A., Gutkin, M.C., Alonso, A.D.C., and Fulop, Z.L. (2012). Use of different morphological techniques to analyze the cellular composition of the adult zebrafish optic tectum. *Microsc. Res. Tech.* *75*, 325–333.

Cummings, S.G., and Bode, H.R. (1984). Head regeneration and polarity reversal in *Hydra attenuata* can occur in the absence of DNA synthesis. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* *194*, 79–86.

Curado, S., Anderson, R.M., Jungblut, B., Mumm, J., Schroeter, E., and Stainier, D.Y.R. (2007). Conditional targeted cell ablation in zebrafish: a new tool for regeneration studies. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *236*, 1025–1035.

D

Dambrose, E., Simion, M., Bourquard, T., Bouffard, S., Rizzi, B., Jaszczyszyn, Y., Bourge, M., Affaticati, P., Heuzé, A., Jouralet, J., et al. (2017). Post-embryonic Fish Brain Proliferation Zones Exhibit Neuroepithelial-type Gene Expression Profile: Features of neuroepithelial cells in fish. *STEM CELLS*.

Darlington, L.G., Mackay, G.M., Forrest, C.M., Stoy, N., George, C., and Stone, T.W. (2007). Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 2211–2221.

Davison, J.M., Akitake, C.M., Goll, M.G., Rhee, J.M., Gosse, N., Baier, H., Halpern, M.E., Leach, S.D., and Parsons, M.J. (2007). Transactivation from Gal4-VP16 transgenic insertions for tissue-specific cell labeling and ablation in zebrafish. *Dev. Biol.* *304*, 811–824.

Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., and Cameron, H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* *460*, 563–572.

Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., and Baier, H. (2008). Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* *134*, 1055–1065.

Del Bene, F., Wyart, C., Robles, E., Tran, A., Looger, L., Scott, E.K., Isacoff, E.Y., and Baier, H. (2010). Filtering of visual information in the tectum by an identified neural circuit. *Science* *330*, 669–673.

Del Debbio, C.B., Balasubramanian, S., Parameswaran, S., Chaudhuri, A., Qiu, F., and Ahmad, I. (2010). Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Müller cells in adult mammalian retina. *PLoS One* *5*, e12425.

Dempsey, R.J., Sailor, K.A., Bowen, K.K., Türeyen, K., and Vemuganti, R. (2003). Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J. Neurochem.* *87*, 586–597.

Devès, M., and Bourrat, F. (2012). Transcriptional mechanisms of developmental cell cycle arrest: problems and models. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 290–297.

Dewulf, V., and Bottjer, S.W. (2005). Neurogenesis within the juvenile zebra finch telencephalic ventricular zone: a map of proliferative activity. *J. Comp. Neurol.* *481*, 70–83.

Dias, T.B., Yang, Y.-J., Ogai, K., Becker, T., and Becker, C.G. (2012). Notch signaling controls generation of motor neurons in the lesioned spinal cord of adult zebrafish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 3245–3252.

Dirian, L., Galant, S., Coolen, M., Chen, W., Bedu, S., Houart, C., Bally-Cuif, L., and Foucher, I. (2014). Spatial regionalization and heterochrony in the formation of adult pallial neural stem cells. *Dev. Cell* *30*, 123–136.

Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* *97*, 703–716.

Dong, W., Lee, R.H., Xu, H., Yang, S., Pratt, K.G., Cao, V., Song, Y.-K., Nurmikko, A., and Aizenman, C.D. (2009). Visual avoidance in *Xenopus* tadpoles is correlated with the maturation of visual responses in the optic tectum. *J. Neurophysiol.* *101*, 803–815.

D’Orazi, F.D., Zhao, X.-F., Wong, R.O., and Yoshimatsu, T. (2016). Mismatch of Synaptic Patterns between Neurons Produced in Regeneration and during Development of the Vertebrate Retina. *Curr. Biol. CB* *26*, 2268–2279.

E

Edwards, D.I. (1993). Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* *31*, 9–20.

Edwards, M.A., Caviness, V.S., and Schneider, G.E. (1986). Development of cell and fiber lamination in the mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* *248*, 395–409.

Eifert, C., Farnworth, M., Schutz-Mirbach, T. (2014). Brain size variation in extremophile fish: local adaptation versus phenotypic plasticity. *J. Zool.* *295*(2):143-153.

Ekdahl, C.T., Claasen, J.-H., Bonde, S., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13632–13637.

Ekström, P., Johnsson, C.M., and Ohlin, L.M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J. Comp. Neurol.* *436*, 92–110.

El-Kheir, W.A., Gabr, H., Awad, M.R., Ghannam, O., Barakat, Y., Farghali, H.A.M.A., El Maadawi, Z.M., Ewes, I., and Sabaawy, H.E. (2014). Autologous bone marrow-derived cell therapy combined with physical therapy induces functional improvement in chronic spinal cord injury patients. *Cell Transplant.* *23*, 729–745.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* *4*, 1313–1317.

F

Faillace, M.P., Julian, D., and Korenbrot, J.I. (2002). Mitotic activation of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina: regulatory signals and molecular markers. *J. Comp. Neurol.* *451*, 127–141.

Fausett, B.V., and Goldman, D. (2006). A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 6303–6313.

Fehlings, M.G., and Baptiste, D.C. (2005). Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury* *36 Suppl 2*, B113-122.

Feigin, V.L., Forouzanfar, M.H., Krishnamurthi, R., Mensah, G.A., Connor, M., Bennett, D.A., Moran, A.E., Sacco, R.L., Anderson, L., Truelsen, T., et al. (2014). Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* *383*, 245–254.

Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Cipolloni, P.B., Storey, E., and Beal, M.F. (1993). Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp. Neurol.* *119*, 46–71.

Fimbel, S.M., Montgomery, J.E., Burket, C.T., and Hyde, D.R. (2007). Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 1712–1724.

Foucher, I., Mione, M., Simeone, A., Acampora, D., Bally-Cuif, L., and Houart, C. (2006). Differentiation of cerebellar cell identities in absence of Fgf signalling in zebrafish *Otx* morphants. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 1891–1900.

Fraser, B., DuVal, M.G., Wang, H., and Allison, W.T. (2013). Regeneration of cone photoreceptors when cell ablation is primarily restricted to a particular cone subtype. *PLoS One* *8*, e55410.

G

Gahtan, E., Tanger, P., and Baier, H. (2005). Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 9294–9303.

- Galant, S., Furlan, G., Coolen, M., Dirian, L., Foucher, I., and Bally-Cuif, L. (2016). Embryonic origin and lineage hierarchies of the neural progenitor subtypes building the zebrafish adult midbrain. *Dev. Biol.* *420*, 120–135.
- Ganz, J., Kaslin, J., Hochmann, S., Freudenreich, D., and Brand, M. (2010). Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. *Glia* *58*, 1345–1363.
- Gargioli, C., and Slack, J.M.W. (2004). Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2669–2679.
- Ghosh, S., and Hui, S.P. (2016). Regeneration of Zebrafish CNS: Adult Neurogenesis. *Neural Plast.* *2016*, 5815439.
- Ginsberg, M.D., and Busto, R. (1989). Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* *20*, 1627–1642.
- Godoy, R., Noble, S., Yoon, K., Anisman, H., and Ekker, M. (2015). Chemogenetic ablation of dopaminergic neurons leads to transient locomotor impairments in zebrafish larvae. *J. Neurochem.* *135*, 249–260.
- Goldman, S.A., and Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 2390–2394.
- Goldshmit, Y., Sztal, T.E., Jusuf, P.R., Hall, T.E., Nguyen-Chi, M., and Currie, P.D. (2012). Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 7477–7492.
- González-Rosa, J.M., Burns, C.E., and Burns, C.G. (2017). Zebrafish heart regeneration: 15 years of discoveries. *Regen. Oxf. Engl.* *4*, 105–123.
- Göritz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., and Frisén, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* *333*, 238–242.
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 777–788.
- Götz, M., Sirko, S., Beckers, J., and Irmeler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* *63*, 1452–1468.
- Gould, E., Reeves, A.J., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C.G., and Fuchs, E. (1999). Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 5263–5267.
- Gramage, E., Li, J., and Hitchcock, P. (2014). The expression and function of midkine in the vertebrate retina. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 913–923.
- Grandel, H., and Brand, M. (2013). Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Dev. Genes Evol.* *223*, 131–147.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* *295*, 263–277.
- Grove, E.A. (2008). Turning neurons into a nervous system. *Development* *135*, 2203–2206.

Grupp, L., Wolburg, H., and Mack, A.F. (2010). Astroglial structures in the zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* *518*, 4277–4287.

Guillemin, G.J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* *279*, 1356–1365.

Guise, C.P., Grove, J.I., Hyde, E.I., and Searle, P.F. (2007). Direct positive selection for improved nitroreductase variants using SOS triggering of bacteriophage lambda lytic cycle. *Gene Ther.* *14*, 690–698.

Guo, Y., Ma, L., Cristofanilli, M., Hart, R.P., Hao, A., and Schachner, M. (2011). Transcription factor Sox11b is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *Neuroscience* *172*, 329–341.

H

Hagerman, G.F., Noel, N.C.L., Cao, S.Y., DuVal, M.G., Oel, A.P., and Allison, W.T. (2016). Rapid Recovery of Visual Function Associated with Blue Cone Ablation in Zebrafish. *PLoS One* *11*, e0166932.

Hamilton, L.K., Truong, M.K.V., Bednarczyk, M.R., Aumont, A., and Fernandes, K.J.L. (2009). Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* *164*, 1044–1056.

Hamon, A., Roger, J.E., Yang, X.-J., and Perron, M. (2016). Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *245*, 727–738.

Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* *10*, 1387–1394.

Harding, M.J., McGraw, H.F., and Nechiporuk, A. (2014). The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 2549–2558.

Hooker, D. (1930). Physiological reactions of goldfish with severed spinal cord. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *28*, 89-90.

Horky, L.L., Galimi, F., Gage, F.H., and Horner, P.J. (2006). Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J. Comp. Neurol.* *498*, 525–538.

Huber, C., Marschallinger, J., Tempfer, H., Furtner, T., Couillard-Despres, S., Bauer, H.-C., Rivera, F.J., and Aigner, L. (2011). Inhibition of leukotriene receptors boosts neural progenitor proliferation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *28*, 793–804.

Huebner, E.A., and Strittmatter, S.M. (2009). Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results Probl. Cell Differ.* *48*, 339–351.

Hyder, A.A., Wunderlich, C.A., Puvanachandra, P., Gururaj, G., and Kobusingye, O.C. (2007). The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation* *22*, 341–353.

I

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2009). Continuous neurogenesis in the adult brain. *Dev. Growth Differ.* *51*, 379–386.

Imitola, J., Raddassi, K., Park, K.I., Mueller, F.-J., Nieto, M., Teng, Y.D., Frenkel, D., Li, J., Sidman, R.L., Walsh, C.A., et al. (2004). Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 18117–18122.

Iosif, R.E., Ekdahl, C.T., Ahlenius, H., Pronk, C.J.H., Bonde, S., Kokaia, Z., Jacobsen, S.-E.W., and Lindvall, O. (2006). Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 9703–9712.

Iosif, R.E., Ahlenius, H., Ekdahl, C.T., Darsalia, V., Thored, P., Jovinge, S., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2008). Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 1574–1587.

Ito, H., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., and Yamamoto, N. (2007). Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain. Behav. Evol.* *69*, 76–86.

Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H., and Ohshima, T. (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Dev. Biol.* *342*, 26–38.

J

Jaerve, A., and Müller, H.W. (2012). Chemokines in CNS injury and repair. *Cell Tissue Res.* *349*, 229–248.

Jakubs, K., Bonde, S., Iosif, R.E., Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., Kokaia, M., and Lindvall, O. (2008). Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 12477–12488.

Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Bateur, S., Simon, R.P., and Greenberg, D.A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4710–4715.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11946–11950.

Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Peel, A., Mao, X.O., Bateur, S., and Greenberg, D.A. (2003). Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 171–189.

Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisén, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* *96*, 25–34.

Joly, J.-S., Recher, G., Brombin, A., Ngo, K., and Hartenstein, V. (2016). A Conserved Developmental Mechanism Builds Complex Visual Systems in Insects and Vertebrates. *Curr. Biol. CB* *26*, R1001–R1009.

Jorstad, N.L., Wilken, M.S., Grimes, W.N., Wohl, S.G., VandenBosch, L.S., Yoshimatsu, T., Wong, R.O., Rieke, F., and Reh, T.A. (2017). Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature* *548*, 103–107.

K

- Kang, J., Hu, J., Karra, R., Dickson, A.L., Tornini, V.A., Nachtrab, G., Gemberling, M., Goldman, J.A., Black, B.L., and Poss, K.D. (2016). Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature* 532, 201–206.
- Kang, S.H., Fukaya, M., Yang, J.K., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E. (2010). NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68, 668–681.
- Kaslin, J., Ganz, J., and Brand, M. (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 101–122.
- Kaslin, J., Ganz, J., Geffarth, M., Grandel, H., Hans, S., and Brand, M. (2009). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 6142–6153.
- Kaslin, J., Kroehne, V., Benato, F., Argenton, F., and Brand, M. (2013). Development and specification of cerebellar stem and progenitor cells in zebrafish: from embryo to adult. *Neural Develop.* 8, 9.
- Kaslin, J., Kroehne, V., Ganz, J., Hans, S., and Brand, M. (2017). Distinct roles of neuroepithelial-like and radial glia-like progenitor cells in cerebellar regeneration. *Dev. Camb. Engl.* 144, 1462–1471.
- Kee, N.J., Preston, E., and Wojtowicz, J.M. (2001). Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp. Brain Res.* 136, 313–320.
- Keil, J.H. (1940). Functionnal spinal cord regeneration in adult rainbow-fish. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 43, 175-177.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 203, 253–310.
- Kirsche, W., and Kirsche, K. (1961). [Experimental studies on the problem of regeneration and function of the tectum opticum of *Carassium carassium* L.]. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 67, 140–182.
- Kishimoto, N., Shimizu, K., and Sawamoto, K. (2012). Neuronal regeneration in a zebrafish model of adult brain injury. *Dis. Model. Mech.* 5, 200–209.
- Kizil, C., Kyritsis, N., Dudczig, S., Kroehne, V., Freudenreich, D., Kaslin, J., and Brand, M. (2012a). Regenerative neurogenesis from neural progenitor cells requires injury-induced expression of Gata3. *Dev. Cell* 23, 1230–1237.
- Kizil, C., Dudczig, S., Kyritsis, N., Machate, A., Blaesche, J., Kroehne, V., and Brand, M. (2012b). The chemokine receptor *cxcr5* regulates the regenerative neurogenesis response in the adult zebrafish brain. *Neural Develop.* 7, 27.
- Kizil, C., Kaslin, J., Kroehne, V., and Brand, M. (2012c). Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 429–461.
- Kizil, C., Kyritsis, N., and Brand, M. (2015). Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO Rep.* 16, 416–426.

Koke, J.R., Mosier, A.L., and García, D.M. (2010). Intermediate filaments of zebrafish retinal and optic nerve astrocytes and Müller glia: differential distribution of cytokeratin and GFAP. *BMC Res. Notes* 3, 50.

Kornack, D.R., and Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5768–5773.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.

Kroehne, V., Freudenreich, D., Hans, S., Kaslin, J., and Brand, M. (2011). Regeneration of the adult zebrafish brain from neurogenic radial glia-type progenitors. *Development* 138, 4831–4841.

Kurz-Isler, G., and Wolburg, H. (1982). Morphological study on the regeneration of the retina in the rainbow trout after ouabain-induced damage: evidence for dedifferentiation of photoreceptors. *Cell Tissue Res.* 225, 165–178.

Kuscha, V., Frazer, S.L., Dias, T.B., Hibi, M., Becker, T., and Becker, C.G. (2012). Lesion-induced generation of interneuron cell types in specific dorsoventral domains in the spinal cord of adult zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 520, 3604–3616.

Kyritsis, N., Kizil, C., Zocher, S., Kroehne, V., Kaslin, J., Freudenreich, D., Iltzsche, A., and Brand, M. (2012). Acute inflammation initiates the regenerative response in the adult zebrafish brain. *Science* 338, 1353–1356.

L

Lenkowski, J.R., and Raymond, P.A. (2014). Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog. Retin. Eye Res.* 40, 94–123.

Lenkowski, J.R., Qin, Z., Sifuentes, C.J., Thummel, R., Soto, C.M., Moens, C.B., and Raymond, P.A. (2013). Retinal regeneration in adult zebrafish requires regulation of TGF β signaling. *Glia* 61, 1687–1697.

Leonard, R.B., Coggeshall, R.E., and Willis, W.D. (1978). A documentation of an age related increase in neuronal and axonal numbers in the stingray, *Dasyatis sabina*, Leseuer. *J. Comp. Neurol.* 179, 13–21.

Leventhal, C., Rafii, S., Rafii, D., Shahar, A., and Goldman, S.A. (1999). Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 450–464.

Li, L., Yan, B., Shi, Y.-Q., Zhang, W.-Q., and Wen, Z.-L. (2012). Live imaging reveals differing roles of macrophages and neutrophils during zebrafish tail fin regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 25353–25360.

Li, Y., Chen, J., and Chopp, M. (2002). Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats. *J. Neurol. Sci.* 193, 137–146.

Lindmark, D.G., and Müller, M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10, 476–482.

Lindsey, B.W., and Tropepe, V. (2006). A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* 80, 281–307.

Lindvall, O., Kokaia, Z., and Martinez-Serrano, A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat. Med.* *10 Suppl*, S42-50.

Liu, X.S., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Gregg, S., Morris, D.C., Wang, Y., and Chopp, M. (2007a). Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *27*, 564–574.

Liu, Z., Fan, Y., Won, S.J., Neumann, M., Hu, D., Zhou, L., Weinstein, P.R., and Liu, J. (2007b). Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* *38*, 146–152.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 2074–2077.

Lois, C., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* *271*, 978–981.

Lust, K., Sinn, R., Pérez Saturnino, A., Centanin, L., and Wittbrodt, J. (2016). De novo neurogenesis by targeted expression of *atox1* to Müller glia cells. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 1874–1883.

Lytle, J.M., and Wrathall, J.R. (2007). Glial cell loss, proliferation and replacement in the contused murine spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *25*, 1711–1724.

M

Mader, M.M., and Cameron, D.A. (2004). Photoreceptor differentiation during retinal development, growth, and regeneration in a metamorphic vertebrate. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 11463–11472.

Magnusson, J.P., Göritz, C., Tatarishvili, J., Dias, D.O., Smith, E.M.K., Lindvall, O., Kokaia, Z., and Frisén, J. (2014). A latent neurogenic program in astrocytes regulated by Notch signaling in the mouse. *Science* *346*, 237–241.

Maier, W., and Wolburg, H. (1979). Regeneration of the goldfish retina after exposure to different doses of ouabain. *Cell Tissue Res.* *202*, 99–118.

Mäkelä, J., Koivuniemi, R., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2010). Interferon-gamma produced by microglia and the neuropeptide PACAP have opposite effects on the viability of neural progenitor cells. *PLoS One* *5*, e11091.

Malatesta, P., Hartfuss, E., and Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 5253–5263.

Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* *37*, 751–764.

Malatesta, P., Appolloni, I., and Calzolari, F. (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res.* *331*, 165–178.

März, M., Schmidt, R., Rastegar, S., and Strähle, U. (2010). Expression of the transcription factor *Olig2* in proliferating cells in the adult zebrafish telencephalon. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *239*, 3336–3349.

- März, M., Schmidt, R., Rastegar, S., and Strähle, U. (2011). Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 2221–2231.
- Meek, J., and Schellart, N.A. (1978). A Golgi study of goldfish optic tectum. *J. Comp. Neurol.* 182, 89–122.
- Meletis, K., Barnabé-Heider, F., Carlén, M., Evergren, E., Tomilin, N., Shupliakov, O., and Frisé, J. (2008). Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol.* 6, e182.
- Meyers, J.R., Hu, L., Moses, A., Kaboli, K., Papandrea, A., and Raymond, P.A. (2012). β -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. *Neural Develop.* 7, 30.
- Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.* 213, 286–300.
- Miyake, A., and Araki, M. (2014). Retinal stem/progenitor cells in the ciliary marginal zone complete retinal regeneration: a study of retinal regeneration in a novel animal model. *Dev. Neurobiol.* 74, 739–756.
- Mokalled, M.H., Patra, C., Dickson, A.L., Endo, T., Stainier, D.Y.R., and Poss, K.D. (2016). Injury-induced *ctgfa* directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science* 354, 630–634.
- Monaghan, J.R., and Maden, M. (2013). Cellular plasticity during vertebrate appendage regeneration. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 367, 53–74.
- Monje, M.L., Toda, H., and Palmer, T.D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760–1765.
- Montgomery, J.E., Parsons, M.J., and Hyde, D.R. (2010). A novel model of retinal ablation demonstrates that the extent of rod cell death regulates the origin of the regenerated zebrafish rod photoreceptors. *J. Comp. Neurol.* 518, 800–814.
- Mori, T., Buffo, A., and Götz, M. (2005). The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 69, 67–99.
- Morris, A.C., Schroeter, E.H., Bilotta, J., Wong, R.O.L., and Fadool, J.M. (2005). Cone survival despite rod degeneration in XOPS-mCFP transgenic zebrafish. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 4762–4771.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082.
- Moss, J.B., Koustubhan, P., Greenman, M., Parsons, M.J., Walter, I., and Moss, L.G. (2009). Regeneration of the pancreas in adult zebrafish. *Diabetes* 58, 1844–1851.
- Mothe, A.J., and Tator, C.H. (2005). Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience* 131, 177–187.
- Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K. (2013). Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Curr. Biol. CB* 23, 307–311.

N

- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., and Nakafuku, M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* *110*, 429–441.
- Nato, G., Caramello, A., Trova, S., Avataneo, V., Rolando, C., Taylor, V., Buffo, A., Peretto, P., and Luzzati, F. (2015). Striatal astrocytes produce neuroblasts in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 840–845.
- Negishi, K., Teranishi, T., Kato, S., and Nakamura, Y. (1987). Paradoxical induction of dopaminergic cells following intravitreal injection of high doses of 6-hydroxydopamine in juvenile carp retina. *Brain Res.* *430*, 67–79.
- Negishi, K., Sugawara, K., Shinagawa, S., Teranishi, T., Kuo, C.H., and Takasaki, Y. (1991a). Induction of immunoreactive proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in goldfish retina following intravitreal injection with tunicamycin. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *63*, 71–83.
- Negishi, K., Stell, W.K., Teranishi, T., Karkhanis, A., Owusu-Yaw, V., and Takasaki, Y. (1991b). Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-immunoreactive cells in goldfish retina following intravitreal injection with 6-hydroxydopamine. *Cell. Mol. Neurobiol.* *11*, 639–659.
- Nelson, C.M., Gorsuch, R.A., Bailey, T.J., Ackerman, K.M., Kassen, S.C., and Hyde, D.R. (2012). Stat3 defines three populations of Müller glia and is required for initiating maximal müller glia proliferation in the regenerating zebrafish retina. *J. Comp. Neurol.* *520*, 4294–4311.
- Nelson, C.M., Ackerman, K.M., O'Hayer, P., Bailey, T.J., Gorsuch, R.A., and Hyde, D.R. (2013). Tumor necrosis factor- α is produced by dying retinal neurons and is required for Muller glia proliferation during zebrafish retinal regeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 6524–6539.
- Nevin, L.M., Robles, E., Baier, H., and Scott, E.K. (2010). Focusing on optic tectum circuitry through the lens of genetics. *BMC Biol.* *8*, 126.
- Nguyen, V., Deschet, K., Henrich, T., Godet, E., Joly, J.S., Wittbrodt, J., Chourrout, D., and Bourrat, F. (1999). Morphogenesis of the optic tectum in the medaka (*Oryzias latipes*): a morphological and molecular study, with special emphasis on cell proliferation. *J. Comp. Neurol.* *413*, 385–404.
- Nieuwenhuys, R. (2009). The forebrain of actinopterygians revisited. *Brain. Behav. Evol.* *73*, 229–252.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., and Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 9–22.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., and Kriegstein, A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 3161–3173.
- Nomura, H., Kim, H., Mothe, A., Zahir, T., Kulbatski, I., Morshead, C.M., Shoichet, M.S., and Tator, C.H. (2010). Endogenous radial glial cells support regenerating axons after spinal cord transection. *Neuroreport* *21*, 871–876.

O

Ogai, K., Nakatani, K., Hisano, S., Sugitani, K., Koriyama, Y., and Kato, S. (2014). Function of Sox2 in ependymal cells of lesioned spinal cords in adult zebrafish. *Neurosci. Res.* *88*, 84–87.

Ohab, J.J., Fleming, S., Blesch, A., and Carmichael, S.T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 13007–13016.

Ohnmacht, J., Yang, Y., Maurer, G.W., Barreiro-Iglesias, A., Tsarouchas, T.M., Wehner, D., Sieger, D., Becker, C.G., and Becker, T. (2016). Spinal motor neurons are regenerated after mechanical lesion and genetic ablation in larval zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 1464–1474.

de Oliveira-Carlos, V., Ganz, J., Hans, S., Kaslin, J., and Brand, M. (2013). Notch receptor expression in neurogenic regions of the adult zebrafish brain. *PLoS One* *8*, e73384.

P

Parent, J.M., Vexler, Z.S., Gong, C., Derugin, N., and Ferriero, D.M. (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann. Neurol.* *52*, 802–813.

Parish, C.L., Beljajeva, A., Arenas, E., and Simon, A. (2007). Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2881–2887.

Park, H.-C., Shin, J., Roberts, R.K., and Appel, B. (2007). An olig2 reporter gene marks oligodendrocyte precursors in the postembryonic spinal cord of zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *236*, 3402–3407.

Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.-M., Marmignon, M.-H., Brion, F., Pakdel, F., and Kah, O. (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* *501*, 150–167.

Pencea, V., Bingaman, K.D., Freedman, L.J., and Luskin, M.B. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp. Neurol.* *172*, 1–16.

Pennacchio, L.A., Ahituv, N., Moses, A.M., Prabhakar, S., Nobrega, M.A., Shoukry, M., Minovitsky, S., Dubchak, I., Holt, A., Lewis, K.D., et al. (2006). In vivo enhancer analysis of human conserved non-coding sequences. *Nature* *444*, 499–502.

Perez-Asensio, F.J., Perpiñá, U., Planas, A.M., and Pozas, E. (2013). Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J. Cell Sci.* *126*, 4208–4219.

Petrescu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 6106–6113.

Pinto, L., and Götz, M. (2007). Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS. *Prog. Neurobiol.* *83*, 2–23.

Pisharath, H., Rhee, J.M., Swanson, M.A., Leach, S.D., and Parsons, M.J. (2007). Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase. *Mech. Dev.* *124*, 218–229.

Pollak, J., Wilken, M.S., Ueki, Y., Cox, K.E., Sullivan, J.M., Taylor, R.J., Levine, E.M., and Reh, T.A. (2013). ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 2619–2631.

Poss, K.D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 710–722.

Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* *298*, 2188–2190.

Poss, K.D., Keating, M.T., and Nechiporuk, A. (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *226*, 202–210.

Prince, V.E., Anderson, R.M., and Dalgin, G. (2017). Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies. *Curr. Top. Dev. Biol.* *124*, 235–276.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D. Coquery, J.M., Tajeddine, N., Gailly, P., Volterra, A., Jeannerod, M. (2005). *Neurosciences. De Boeck Supérieur.*

Q

Qin, Z., Barthel, L.K., and Raymond, P.A. (2009). Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9310–9315.

R

Ramachandran, R., Reifler, A., Parent, J.M., and Goldman, D. (2010a). Conditional gene expression and lineage tracing of tuba1a expressing cells during zebrafish development and retina regeneration. *J. Comp. Neurol.* *518*, 4196–4212.

Ramachandran, R., Fausett, B.V., and Goldman, D. (2010b). Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* *12*, 1101–1107.

Ramachandran, R., Zhao, X.-F., and Goldman, D. (2011). Ascl1a/Dkk/beta-catenin signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3beta inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 15858–15863.

Ramachandran, R., Zhao, X.-F., and Goldman, D. (2012). Insm1a-mediated gene repression is essential for the formation and differentiation of Müller glia-derived progenitors in the injured retina. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1013–1023.

Rapacioli, M., Palma, V., and Flores, V. (2016). Morphogenetic and Histogenetic Roles of the Temporal-Spatial Organization of Cell Proliferation in the Vertebrate Corticogenesis as Revealed by Inter-specific Analyses of the Optic Tectum Cortex Development. *Front. Cell. Neurosci.* *10*, 67.

Raymond, P.A. (2016). Regeneration: New Neurons Wire Up. *Curr. Biol. CB* *26*, R794-796.

Raymond, P.A., Reifler, M.J., and Rivlin, P.K. (1988). Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J. Neurobiol.* *19*, 431–463.

Raymond, P.A., Barthel, L.K., Bernardos, R.L., and Perkowski, J.J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev. Biol.* *6*, 36.

Recher, G., Jouralet, J., Brombin, A., Heuzé, A., Mugniery, E., Hermel, J.-M., Desnoulez, S., Savy, T., Herbomel, P., Bourrat, F., et al. (2013). Zebrafish midbrain slow-amplifying progenitors exhibit high levels of transcripts for nucleotide and ribosome biogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 4860–4869.

Reimer, M.M., Sörensen, I., Kuscha, V., Frank, R.E., Liu, C., Becker, C.G., and Becker, T. (2008). Motor neuron regeneration in adult zebrafish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 8510–8516.

Reimer, M.M., Kuscha, V., Wyatt, C., Sörensen, I., Frank, R.E., Knüwer, M., Becker, T., and Becker, C.G. (2009). Sonic hedgehog is a polarized signal for motor neuron regeneration in adult zebrafish. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 15073–15082.

Reimer, M.M., Norris, A., Ohnmacht, J., Patani, R., Zhong, Z., Dias, T.B., Kuscha, V., Scott, A.L., Chen, Y.-C., Rozov, S., et al. (2013). Dopamine from the brain promotes spinal motor neuron generation during development and adult regeneration. *Dev. Cell* *25*, 478–491.

Robel, S., Berninger, B., and Götz, M. (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 88–104.

Robles, E., Smith, S.J., and Baier, H. (2011). Characterization of genetically targeted neuron types in the zebrafish optic tectum. *Front. Neural Circuits* *5*, 1.

Rodriguez Viales, R., Diotel, N., Ferg, M., Armant, O., Eich, J., Alunni, A., März, M., Bally-Cuif, L., Rastegar, S., and Strähle, U. (2015). The helix-loop-helix protein *id1* controls stem cell proliferation during regenerative neurogenesis in the adult zebrafish telencephalon. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 892–903.

Roeser, T., and Baier, H. (2003). Visuomotor behaviors in larval zebrafish after GFP-guided laser ablation of the optic tectum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 3726–3734.

Rosenberg, A.F., Wolman, M.A., Franzini-Armstrong, C., and Granato, M. (2012). In vivo nerve-macrophage interactions following peripheral nerve injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 3898–3909.

Rothensaigner, I., Krecsmarik, M., Hayes, J.A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Götz, M., Jagasia, R., and Bally-Cuif, L. (2011). Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 1459–1469.

S

Sabelström, H., Stenudd, M., Réu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Göritz, C., and Frisé, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* *342*, 637–640.

Sabelström, H., Stenudd, M., and Frisé, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Exp. Neurol.* *260*, 44–49.

Sánchez Alvarado, A. (2000). Regeneration in the metazoans: why does it happen? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *22*, 578–590.

Sauer, F.C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol* *62*: 377–405.

Scott, E.K., and Baier, H. (2009). The cellular architecture of the larval zebrafish tectum, as revealed by gal4 enhancer trap lines. *Front. Neural Circuits* 3, 13.

Seeley, E.S., and Nachury, M.V. (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J. Cell Sci.* 123, 511–518.

Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7153–7160.

Sharp, F.R., Liu, J., and Bernabeu, R. (2002). Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 134, 23–30.

Shimada, I.S., LeComte, M.D., Granger, J.C., Quinlan, N.J., and Spees, J.L. (2012). Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 7926–7940.

Simon, C., Götz, M., and Dimou, L. (2011). Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59, 869–881.

Sîrbulescu, R.F., and Zupanc, G.K.H. (2011). Spinal cord repair in regeneration-competent vertebrates: adult teleost fish as a model system. *Brain Res. Rev.* 67, 73–93.

Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P.A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., et al. (2013). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell* 12, 426–439.

Skaggs, K., Goldman, D., and Parent, J.M. (2014). Excitotoxic brain injury in adult zebrafish stimulates neurogenesis and long-distance neuronal integration. *Glia* 62, 2061–2079.

Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 10–18.

Stigloher, C., Chapouton, P., Adolf, B., and Bally-Cuif, L. (2008). Identification of neural progenitor pools by E(Spl) factors in the embryonic and adult brain. *Brain Res. Bull.* 75, 266–273.

Stone, T.W., Forrest, C.M., Stoy, N., and Darlington, L.G. (2012). Involvement of kynurenines in Huntington's disease and stroke-induced brain damage. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 119, 261–274.

Suster, M.L., Kikuta, H., Urasaki, A., Asakawa, K., and Kawakami, K. (2009). Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 561, 41–63.

T

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.

Takasawa, K., Kitagawa, K., Yagita, Y., Sasaki, T., Tanaka, S., Matsushita, K., Ohstuki, T., Miyata, T., Okano, H., Hori, M., et al. (2002). Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 299–307.

Tallafuss, A., and Bally-Cuif, L. (2003). Tracing of her5 progeny in zebrafish transgenics reveals the dynamics of midbrain-hindbrain neurogenesis and maintenance. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 4307–4323.

Taverna, E., and Huttner, W.B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* *67*, 906–914.

Teh, C., Chudakov, D.M., Poon, K.-L., Mamedov, I.Z., Sek, J.-Y., Shidlovsky, K., Lukyanov, S., and Korzh, V. (2010). Optogenetic in vivo cell manipulation in KillerRed-expressing zebrafish transgenics. *BMC Dev. Biol.* *10*, 110.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* *414*, 112–117.

Than-Trong, E., and Bally-Cuif, L. (2015). Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system. *Glia* *63*, 1406–1428.

Thomas, J.L., Nelson, C.M., Luo, X., Hyde, D.R., and Thummel, R. (2012). Characterization of multiple light damage paradigms reveals regional differences in photoreceptor loss. *Exp. Eye Res.* *97*, 105–116.

Thomas, J.L., Ranski, A.H., Morgan, G.W., and Thummel, R. (2016). Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. *Exp. Eye Res.* *143*, 98–109.

Thored, P., Wood, J., Arvidsson, A., Cammenga, J., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2007). Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* *38*, 3032–3039.

Thummel, R., Kassen, S.C., Montgomery, J.E., Enright, J.M., and Hyde, D.R. (2008). Inhibition of Müller glial cell division blocks regeneration of the light-damaged zebrafish retina. *Dev. Neurobiol.* *68*, 392–408.

Tonchev, A.B., Yamashima, T., Sawamoto, K., and Okano, H. (2005). Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* *81*, 776–788.

von Trotha, J.W., Vernier, P., and Bally-Cuif, L. (2014). Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* *40*, 3302–3315.

Tuge, H., Hanzawa, S. (1937). Physiological and morphological regeneration on the sectioned spinal cord in adult teleosts. *J. Comp. Neurol.* *67*, 343–365.

U

Ueki, Y., Wilken, M.S., Cox, K.E., Chipman, L., Jorstad, N., Sternhagen, K., Simic, M., Ullom, K., Nakafuku, M., and Reh, T.A. (2015). Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 13717–13722.

V

Vihetlic, T.S., and Hyde, D.R. (2000). Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J. Neurobiol.* *44*, 289–307.

Villegas, R., Martin, S.M., O'Donnell, K.C., Carrillo, S.A., Sagasti, A., and Allende, M.L. (2012). Dynamics of degeneration and regeneration in developing zebrafish peripheral axons reveals a requirement for extrinsic cell types. *Neural Develop.* *7*, 19.

Visel, A., Minovitsky, S., Dubchak, I., and Pennacchio, L.A. (2007). VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers. *Nucleic Acids Res.* 35, D88-92.

W

Wan, J., Ramachandran, R., and Goldman, D. (2012). HB-EGF is necessary and sufficient for Müller glia dedifferentiation and retina regeneration. *Dev. Cell* 22, 334–347.

Wang, Y., Rovira, M., Yusuff, S., and Parsons, M.J. (2011). Genetic inducible fate mapping in larval zebrafish reveals origins of adult insulin-producing β -cells. *Dev. Camb. Engl.* 138, 609–617.

Wehner, D., Tsarouchas, T.M., Michael, A., Haase, C., Weidinger, G., Reimer, M.M., Becker, T., and Becker, C.G. (2017). Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish. *Nat. Commun.* 8, 126.

White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E., et al. (2008). Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2, 183–189.

White, Y.A.R., Woods, D.C., and Wood, A.W. (2011). A transgenic zebrafish model of targeted oocyte ablation and de novo oogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 1929–1937.

Willardsen, M.I., and Link, B.A. (2011). Cell biological regulation of division fate in vertebrate neuroepithelial cells. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 1865–1879.

Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J., and Kuhn, H.G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1681–1689.

Wolf, S.A., Steiner, B., Wengner, A., Lipp, M., Kammertoens, T., and Kempermann, G. (2009). Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3121–3128.

X

Xiao, T., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2005). A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2955–2967.

Xiao, Y., Faucherre, A., Pola-Morell, L., Heddleston, J.M., Liu, T.-L., Chew, T.-L., Sato, F., Sehara-Fujisawa, A., Kawakami, K., and López-Schier, H. (2015). High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish. *Dis. Model. Mech.* 8, 553–564.

Y

Yagita, Y., Kitagawa, K., Ohtsuki, T., Takasawa, K., Miyata, T., Okano, H., Hori, M., and Matsumoto, M. (2001). Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 32, 1890–1896.

Yamaguchi, M., and Mori, K. (2005). Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9697–9702.

Yamashita, T., Ninomiya, M., Hernández Acosta, P., García-Verdugo, J.M., Sunabori, T., Sakaguchi, M., Adachi, K., Kojima, T., Hirota, Y., Kawase, T., et al. (2006). Subventricular zone-derived neuroblasts

migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 6627–6636.

Yeo, S.-Y., Kim, M., Kim, H.-S., Huh, T.-L., and Chitnis, A.B. (2007). Fluorescent protein expression driven by her4 regulatory elements reveals the spatiotemporal pattern of Notch signaling in the nervous system of zebrafish embryos. *Dev. Biol.* *301*, 555–567.

Yurco, P., and Cameron, D.A. (2005). Responses of Müller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Res.* *45*, 991–1002.

Z

Zattara, E.E., Turlington, K.W., and Bely, A.E. (2016). Long-term time-lapse live imaging reveals extensive cell migration during annelid regeneration. *BMC Dev. Biol.* *16*, 6.

Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Zhang, L., and Chopp, M. (2001). Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* *105*, 33–41.

Zhang, R.L., Chopp, M., Roberts, C., Liu, X., Wei, M., Nejad-Davarani, S.P., Wang, X., and Zhang, Z.G. (2014). Stroke increases neural stem cells and angiogenesis in the neurogenic niche of the adult mouse. *PLoS One* *9*, e113972.

Zhu, D.Y., Liu, S.H., Sun, H.S., and Lu, Y.M. (2003). Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 223–229.

Zikopoulos, B., Kentouri, M., and Dermon, C.R. (2000). Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain. Behav. Evol.* *56*, 310–322.

Zupanc, G.K.H. (2009). Towards brain repair: Insights from teleost fish. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 683–690.

Zupanc, G.K., and Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* *353*, 213–233.

Zupanc, G.K.H., and Sîrbulescu, R.F. (2011). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 917–929.

Zupanc, G.K.H., Hinsch, K., and Gage, F.H. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* *488*, 290–319.

Titre : Processus régénératifs du cerveau moyen dorsal chez le poisson zèbre adulte

Mots clés : Régénération, Toit optique, Poisson zèbre, Cellules neuroépithéliales

Résumé : Contrairement aux mammifères, le système nerveux central du poisson téléostéen adulte possède un fort potentiel de neurogenèse et de régénération à la suite d'une lésion. Chez le poisson zèbre adulte, de nouveaux neurones peuvent être régénérés à partir de progéniteurs constitutifs (ce sont des progéniteurs présents dans le tissu avant lésion) ou latents (ce sont des cellules différenciées qui se dédifférencient en progéniteurs à la suite d'une lésion).

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressée aux capacités de régénération neuronale du cerveau moyen dorsal (le toit optique, TO) chez le poisson zèbre. Le TO présente à sa périphérie une zone de progéniteurs de type neuroépithélial à l'origine des neurones et des cellules épendymogliales qui le constituent.

J'ai tout d'abord identifié une séquence régulatrice du gène *meis2a*, qui m'a permis de réaliser des expériences de lignage cellulaire de progéniteurs neuroépithéliaux. En contexte homéostatique, j'ai montré que ces progéniteurs construisent la totalité du TO pendant le développement et soutiennent sa neurogenèse continue pendant la croissance post-embryonnaire.

A la suite d'une lésion cérébrale chez la larve et l'adulte, le TO a la capacité de générer de nouveaux neurones, toutefois sa structure topographique n'est pas restaurée. Chez l'adulte, j'ai montré que des progéniteurs constitutifs neuroépithéliaux et des progéniteurs latents épendymogliaux sont activés lors du processus de régénération.

Titre : Midbrain regeneration in adult zebrafish

Keywords : Regeneration, Optic tectum, Zebrafish, Neuroepithelial cells

Abstract : Unlike mammals, the adult teleost brain exhibits widespread neurogenic activity and can regenerate after injury. The adult zebrafish has the capacity to regenerate neurons from constitutive or latent progenitors.

During my PhD, I studied the neuronal regeneration in the zebrafish dorsal midbrain (optic tectum, OT). At adult stage, neuroepithelial-like progenitors at the OT periphery contribute to neuronal and glial lineages during homeostasis.

I identified a putative enhancer of *meis2a*, which allowed me to trace the progeny of

neuroepithelial-like progenitors. In a non-regenerative context, I showed that enhancer-targeted progenitors were at the origin of the whole OT during development and of its continued neurogenesis during post-embryonic growth.

Following lesion, OT displayed reactive neurogenesis, at larval and adult stages, nevertheless its topographical structure remained altered. In adults, I showed that both constitutive neuroepithelial-like progenitors and latent ependymoglia progenitors were activated in a regenerative context.